

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenkrankheiten, Kopf-, Hals-, und Plastische
Gesichtschirurgie, Klinikum Fulda,
Lehrkrankenhaus der Universität Marburg

DISSERTATION

**Klinische und molekularzytogenetische Charakterisierung von
Aesthesioneuroblastomen**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Xuejun You

aus Hubei, V.R. China

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prov.-Doz. Dr. med. U. Bockmühl

2. Prof. Dr. med. P. Ambrosch

3. Prof. Dr. med. A. von Deinling

Datum der Promotion: 23.09.2002

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	5
1.1.	Epidemiologie und Klassifikation des Aesthesioneuroblastoms	5
1.2.	Klinik und derzeitiger Stand der Therapie des Aesthesioneuroblastoms	6
1.3.	Molekulargenetik von Neuroblastomen unter besonderer Berücksichtigung des Aesthesioneuroblastoms	8
2.	FRAGESTELLUNG	11
3.	MATERIAL und METHODEN	12
3.1.	Patientengut und Tumormaterial	12
3.2.	Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH)	15
	- DNA-Extraktion	15
	- Metaphasen-Präparation	16
	- DNA-Markierung	16
	- Hybridisierung	16
	- DNA-Nachweis	17
	- Digitale Bildverarbeitung und –auswertung	18
4.	ERGEBNISSE	22
4.1.	Klinisch-pathologische Auswertung der untersuchten Aesthesioneuroblastome	22
4.2.	Molekularzytogenetische Charakterisierung der Aesthesioneuroblastome als Tumorentität	26
4.3.	Vergleich Primärtumor und Metastasen bzw. Rezidivtumoren	29

5.	DISKUSSION	34
5.1.	Das Fuldaer Konzept der operativen Therapie maligner Tumoren der Frontobasis	34
5.2.	Charakteristische chromosomale Alterationen der Tumorentität Aesthesioneuroblastom	37
5.3.	Klonalitätsbestimmung	41
6.	ZUSAMMENFASSUNG	43
7.	LITERATURVERZEICHNIS	45
8.	ANHANG	52
	- Abkürzungsverzeichnis	53
	- Lebenslauf	54
	- Eidesstattliche Erklärung	56
	- Danksagung	57

1. EINLEITUNG

1.1. Epidemiologie und Klassifikation des Aesthesioneuroblastoms

Das Aesthesioneuroblastom gehört zu den seltenen malignen Tumoren der Rhinobasis [Draf & Berghaus 1993, Samii & Draf 1989, Zappia et al. 1993]. Es ist ein aggressiver neuroektodermaler Tumor, der seinen Ausgangspunkt vom endonasalen Neuroepithel der Rima olfactoria bzw. des oberen Septums oder der oberen Nasenmuschel nimmt. Die Inzidenz beträgt ca. 1-5% aller malignen Tumoren der Nasen und Nasennebenhöhlen [O'Connor et al. 1989]. Seit der Erstbeschreibung des Aesthesioneuroblastoms 1924 durch Berger & Luc [Berger et al. 1924] sind weltweit bis zum Jahr 1977 lediglich 170 Fälle [Cantrell et al. 1977] und bis zum Jahr 1997 insgesamt 945 Fälle [Broich et al. 1997] aufgeführt. Es gibt keine eindeutige Geschlechtsspezifität. In der größten zusammenfassenden Übersicht von Broich et al. [Broich et al. 1997] ist eine Geschlechtsverteilung von 53.36% männlichen zu 46.64% weiblichen Betroffenen angegeben. Der Altersgipfel dieser Erkrankung liegt im Erwachsenenalter zwischen dem 3. und 7. Lebensjahrzehnt [Elkon et al. 1979].

In der Literatur ist dieser Tumor unter verschiedenen Synonymen beschrieben, z.B. olfaktorisches Neuroblastom, Aesthesioneurozytom, Aesthesioneuroepitheliom, olfaktorisches Aesthesioneurom, intranasales Neuroblastom, neuroolfaktorischer Tumor, olfaktorisches Neurozytom, olfaktorisches Neuroepitheliom, olfaktorisches Aesthesioneuroepitheliom, olfaktorischer neuroepithelialer Tumor oder Riechplakodentumor [Baron 1979, Schmidt et al. 1990]. Darin spiegelt sich die große Variabilität des histologischen Erscheinungsbildes wieder, das vom Paragangliom über das Neuroblastom bis hin zum Ganglioneuroblastom reichen kann [Hirose et al. 1995]. Das histologische Bild ist von einem kleinzelligen Tumor mit Pseudorosettenbildung gekennzeichnet. Mit Hilfe der Immunhistologie werden differentialdiagnostisch andere Tumoren ausgeschlossen. Typisch für das Aesthesioneuroblastom sind positive Reaktionen auf Vimentin, S-100 Protein, Neurofilamente und neuronspezifische Enolase, die in Verbindung mit dem fehlenden Nachweis für Epithel- und Lymphommarker die Einordnung als neurogenen Tumor erlauben [Devoe et al. 2000, Lund et al. 1993, Wick et al. 1988]. In 10-30% der Fälle kommt es zur lymphogenen oder hämatogenen Metastasierung [Levine et al. 1999, Miyamoto et al. 2000, Resto et al. 2000, Simon et al. 2001]. Die häufigsten Lokalisationen sind dabei die zervikalen Lymphknoten gefolgt von

Hirn-, Lungen- oder Knochenmetastasen [Davis & Weissler 1992, Ranjan & Hennessy 1986]. Die Rezidivraten dieses Malignoms liegen zwischen 38% und 86% [Elkon et al. 1979, Homize & Elkon 1980, Spaulding et al. 1988].

Für das Staging des Aesthesioneuroblastoms existieren verschiedene Klassifikationen (siehe Anhang), die im Anhang aufgeführt sind. Die bislang bekannteste und gebräuchlichste Stadieneinteilung ist die nach Kadish [1976], die durch Morita et al. [1993] um die Einbeziehung der Metastasierung in die Vorhersage der Prognose erweitert wurde. Demgegenüber bewerten die beiden anderen Klassifikationen nach Biller et al. [1990] und Dulguerov [1992] die Infiltration der Keilbeinhöhle als besonders bedeutsam für ein aggressives Krankheitsgeschehen.

Aufgrund der Seltenheit dieses Tumors und der deshalb in der Literatur beschriebenen jeweils nur geringen Fallzahlen ist die Angabe von 5-Jahres-Überlebensraten sehr verschieden und basiert nicht auf statistischen Analysen [Dulguerov et al. 1992, Miyamoto et al. 2000, Obermann & Rice 1976, Resto et al. 2000, Simon et al. 2001]. Broich et al. [1997] fassen eine krankheitsfreie 5-Jahres-Überlebensrate von 63,38% sowie eine 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 81,2% zusammen, unabhängig von Tumorausdehnung und Therapie.

1.2. Klinik und derzeitiger Stand der Therapie des Aesthesioneuroblastoms

Wegen ihres langsamen und okkulten Wachstums werden Aesthesioneuroblastome ebenso wie andere endonasale expansive Prozesse meist erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert [Feyerabend et al. 1990, Kempf et al. 1994, Levine et al. 1999, Walch et al. 2000]. Broich et al. [1997], die 553 in der Literatur aufgeführte Fälle nachklassifiziert haben, beschreiben 18,29% der Tumoren im Stadium A, 32,33% im Stadium B und 49,38% im Stadium C nach Kadish (siehe Anhang). Die Hauptsymptome dieses aggressiven Malignoms sind behinderte Nasenatmung (58-100%), rezidivierend Epistaxis (33-67%), Kopfschmerz (20-50%), Rhinorrhoe (9-67%) und Hyposmie (11-50%). Selten treten primär eine Visusminderung, Doppelbilder, Exophthalmus, Epiphora oder ungerichteter Schwindel auf [Irish et al. 1997, Kempf et al. 1994, Levine et al. 1999, Walch et al. 2000]. In der klinischen Untersuchung zeigt sich das Aesthesioneuroblastom als hellgrau-rötliche, fleischig-polypöse Raumforderung in der Nasenhaupt- bzw. den Nasennebenhöhlen, die auf Berührung leicht blutet (Abbildung 1). Die Diagnosesicherung

erfolgt anhand der histologischen Untersuchung einer Biopsie, die endoskopisch aus der Nase bzw. den Nasennebenhöhlen gewonnen wird. Zur Therapieplanung gehören dann die Bestimmung der Tumorausdehnung mittels der in transversalen, koronaren und saggitalen Schichten durchgeführten Computer- (CT) und Kernspintomographie (MRT). Während die CT die beste Information über den Tumorbefall und die Zerstörung benachbarter knöcherner Strukturen gibt, zeigen sich in der MRT besonders die Tumorausdehnung und die Infiltration umgebender Weichteile, vor allem nach intrakraniell und in die Orbita [Kairemo et al. 1998].

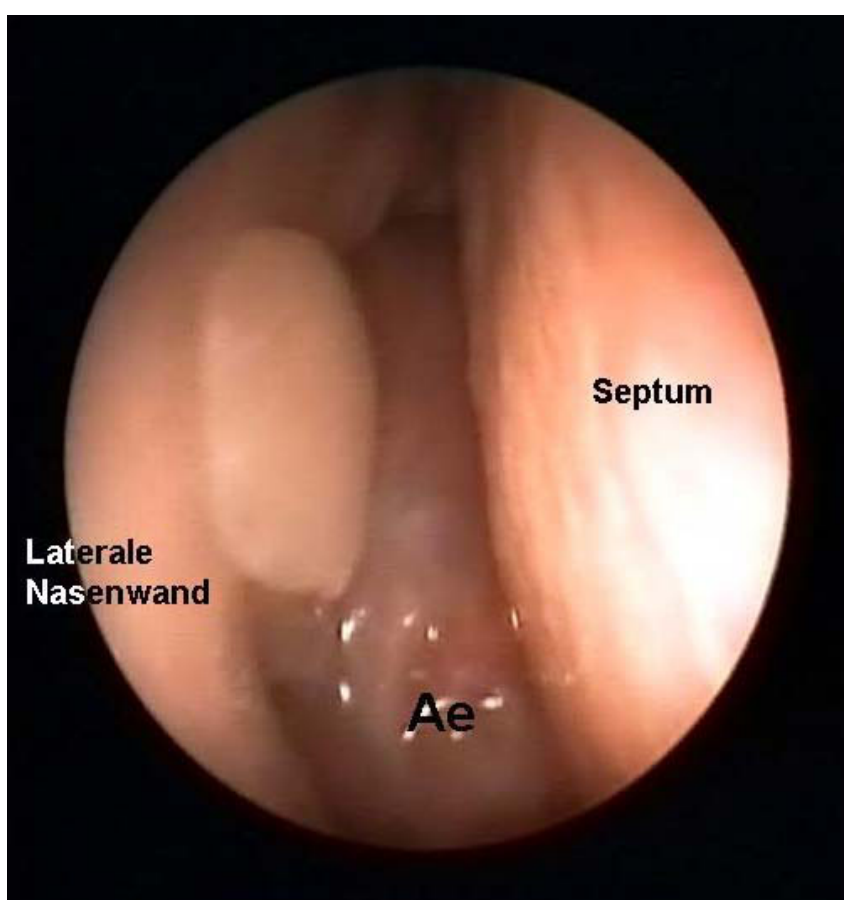


Abbildung 1: Endoskopisches Bild eines Aesthesioneuroblastoms (Ae), rechte Nasenhaupthöhle.

Eine generelle Therapieempfehlung für die Behandlung des Aesthesioneuroblastoms gibt es nicht, da bis heute etablierte, durch umfassende onkologische Studien untermauerte diagnostische und therapeutische Standards fehlen und der klinische Verlauf oft unberechenbar ist [Walch et al. 2000, Zumegen et al. 2000]. Viele Autoren [Biller et al. 1990, Chapman et al. 1981, Eden et al. 1994, Resto et al. 2000] favorisieren die von Smith

[1954] erstmals beschriebene und von Doyle & Payton [1971] erstmals für das Aesthesioneuroblastom angewandte kranio-faziale Blockresektion. Das Ziel dabei ist es, die Tumoren möglichst in toto und mit histologisch kontrolliertem Sicherheitsabstand im Gesunden zu entfernen. Als weitere Therapieoptionen stehen auch bei dieser Tumorentität generell die primäre Bestrahlung und/oder Chemotherapie zur Verfügung, wobei vor allem letztere sehr kontrovers diskutiert wird. Broich et al. [1997] vertreten nach Durchsicht aller Publikationen seit der Erstbeschreibung des Aesthesioneuroblastoms die Meinung, dass eine Kombination aus Chirurgie und Bestrahlung die besten Ergebnisse bringt. Dieses Behandlungskonzept wird auch in den jüngsten Veröffentlichungen von Eriksen et al. [2000], Levine et al. [1999], Resto et al. [2000], Simon et al. [2001] und Walch et al. [2000] favorisiert, vor allem bei Patienten, wo nicht sicher oder nur knapp im Gesunden reseziert werden konnte bzw. die Resektionsränder positiv waren. Bei Anwendung dieser Kombinationstherapie liegen die 5-Jahres-Gesamtüberlebensraten bei 72,5% im Vergleich zu 62,5% nach alleiniger Tumorsektion und 53,9% nach primärer kurativer Strahlentherapie [Broich et al. 1997]. Die tumorbedingten Todesraten sind nach alleiniger Radiatio mit 30,77% am höchsten verglichen mit 18,8% nach Resektion + adjuvante Radiatio und 12,5% nach alleiniger Resektion [Broich et al. 1997]. Der scheinbare Widerspruch der höheren Todesraten nach Kombinationstherapie im Gegensatz zur alleinigen chirurgischen Therapie erklärt sich wohl aus der Potenzierung der Nebenwirkungen.

Mit Hilfe der verbesserten Diagnose- und Therapiestrategien konnte zwar die Prognose des Aesthesioneuroblastoms in der letzten Dekade etwas verbessert werden [Irish et al. 1997, Levine et al. 1999, Simon et al. 2001, Walch et al. 2000, Zumegen et al. 2000], aber bis heute gibt es in der Praxis noch keinen Parameter, mit dem man den Krankheitsverlauf bzw. das biologische Verhalten dieses Malignoms individueller abschätzen kann.

1.3. Molekulargenetik von Neuroblastomen unter besonderer Berücksichtigung des Aesthesioneuroblastoms

Unser Wissen um Initiation und Progression maligner Tumoren hat sich im Verlauf der letzten Jahre durch den Einsatz neuer molekulargenetischer Techniken wesentlich vergrößert. Nach heutigem Wissen geht man davon aus, dass die maligne Transformation über eine Akkumulation mehrerer genetischer Veränderungen erfolgt. Dieser

Stufenprozess wird durch Defekte in spezifischen Genen, den Proto-Onkogenen und den Tumorsuppressorgenen (TSG) wie auch den DNA-Reparatur-Genen ausgelöst. Proto-Onkogene kodieren Proteine, die die Zellteilung und das Wachstum unterstützen, TSG verschlüsseln solche, die es unterdrücken. Beide Genklassen sind normale Bestandteile im menschlichen Genom, und ihr Zusammenwirken im Zellzyklus ist ausgewogen. Infolge genetischer Alterationen können jedoch TSG inaktiviert und Proto-Onkogene zu karzinogenen Onkogenen verändert werden, was dann letztlich zu einer unkontrollierten Zellproliferation führen kann.

Dem Ziel, einen Überblick über genetische Veränderungen am gesamten Genom zu erlangen und damit Anhaltspunkte für die Lokalisationen möglicher TSG bzw. Onkogene zu bekommen, kam bis vor 10 Jahren die klassische Zytogenetik am nächsten. Die Kultivierung solider Tumoren gelingt jedoch nur in ca. 10-30% der Fälle, was den Zugang zu teilungsfähigen Zellen und damit die zytogenetische Diagnostik solider Tumoren wesentlich erschwert. Zudem kann es entsprechend dem Wachstumsverhalten zu einer In-vitro-Selektion bestimmter Zellklone kommen, wodurch die praktische Wertigkeit der zytogenetischen Charakterisierung eingeschränkt ist. Diese Nachteile sind mit der Etablierung der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) überwunden. Diese Methode erlaubt es, in nur einem Hybridisierungsexperiment einen Überblick über alle unbalanzierten chromosomalen Aberrationen eines Tumors zu erlangen [du Manoir et al. 1993, Kallioniemi et al. 1992]. Die Aussagekraft der CGH ist bereits bei verschiedenen soliden Tumoren aufgezeigt worden [Bissig et al. 1999, Isola et al. 1995, Moch et al. 1996, Petersen et al. 1997a, Petersen et al. 1997b, Weber et al. 1996].

Aufgrund des seltenen Auftretens des Aesthesioneuroblastoms existieren bisher keine umfassenden genetischen Analysen dieser Tumorentität. Szymas et al. [1997] haben in einem Einzelfall ein Aesthesioneuroblastom mittels der CGH untersucht. Sie fanden DNA-Sequenzzugewinne ganzer Chromosomen häufig für die Chromosomen 4, 8, 11 und 14 sowie partielle DNA-Überrepräsentierungen auf den langen Armen der Chromosomen 1 und 17. Demgegenüber zeigten sich vollständige DNA-Sequenzverluste für die Chromosomen 16, 18, 19 und X sowie partielle Deletionen auf den Chromosomen 5q und 17p. Vergleicht man diese Ergebnisse mit einer Studie an 35 Neuroblastomen, so differieren die Veränderungen bis auf die Amplifikationen auf 1q [Brinkschmidt et al. 1996]. Die häufigsten chromosomalen Alterationen der Neuroblastome waren Deletionen der Chromosomen 1p, 3, 4, 10, 11q, 14q, 15q und teilweise auch 19. DNA-Sequenzzugewinne wurden bei dieser Tumorentität vor allem im Bereich der

Chromosomen 2, 7, 12q, 13q, 17q, und 18 gefunden. Zahlreiche dieser Veränderungen betrafen nicht nur partielle chromosomale Aberrationen sondern überwiegend ganze Chromosomen oder Chromosomarme.

Welche Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene an der Genese und Progression von Aesthesioneuroblastomen beteiligt sind, ist bisher unklar. Im Gegensatz zu den meisten Malignomen sind bei dieser Tumorentität keine Mutationen des TSG p53 beschrieben [Papadaki et al. 1996]. Überexpressionen des Wild-Typ-Proteins wurden als assoziiert mit immunhistochemischer Überexpression des für den Zellzyklus wichtigen regulatorischen Protein WAF-1 und mit nachfolgendem Auftreten von Rezidiven bzw. einer schlechten Prognose der Patienten gefunden [Papadaki et al. 1996].

2. FRAGESTELLUNG

Nach dem Stand heutigen Wissens verlaufen die karzinogenetischen Prozesse von der malignen Transformation über die Tumorprogression bis hin zur Metastasierung über eine Akkumulation genetischer Alterationen der Zellen eines zunächst normalen Organgewebes. Aufgrund der Seltenheit des Aesthesioneuroblastoms gibt es bisher keine umfassenden molekularzytogenetischen Analysen dieser Tumorentität. In der vorliegenden Arbeit sollen erstmals die chromosomalen Alterationen der Aesthesioneuroblastome bestimmt werden. Desweiteren soll das Behandlungskonzept für diese Tumoren überprüft werden.

Im Einzelnen werden dazu folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Welches ist die optimale Therapie für das Aesthesioneuroblastom, und welchen Stellenwert hat dabei die endonasale Tumorresektion?
- Welche prognostische Aussagekraft haben die Klassifikation nach Morita und das Grading nach Hyams?
- Lässt sich dem Aesthesioneuroblastom ein spezifisches Muster chromosomaler Alterationen zuordnen?
- Lassen sich zwischen metastasierenden und nicht-metastasierenden Aesthesioneuroblastomen spezifische genetische Unterschiede feststellen?
- Lässt sich anhand des genetischen Musters von Primärtumor und Metastasen ein gemeinsamer klonaler Ursprung nachweisen?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Patientengut und Tumormaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden 18 Patienten mit Aesthesioneuroblastomen untersucht. Darunter waren 10 Männer und 8 Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter betrug bei Männern 55,2 Jahre und bei Frauen 44,5 Jahre. Siebzehn Patienten wurden im Zeitraum zwischen 1988 und 2001 in der HNO-Klinik und ein Patient in der Neurochirurgischen Klinik des Klinikums Fulda operiert. Bis auf eine Patientin wurden alle postoperativ bestrahlt, z.T. stereotaktisch. Zwei Patienten stellten sich mit einem Residualtumor nach auswärtiger primärer Operation (Fälle 2, 12) bzw. nach primär auswärts durchgeführter Radiatio (Fall 16) zur Operation in der HNO-Klinik vor. Bei einem weiteren Patienten wurde zunächst primär neurochirurgisch der intrazerebrale Tumoranteil reseziert und zweizeitig in der HNO-Klinik der Tumoranteil im Bereich der Nase bzw. Nasennebenhöhlen. Der postoperative Beobachtungszeitraum betrug längstens 163 Monate. Acht Patienten waren innerhalb dieser Zeit verstorben, davon 6 am Tumorleiden (in 4 Fällen durch Fernmetastasen, 2x durch Lokalrezidive). Ein Patient verstarb an postoperativen Komplikationen und ein weiterer an einem Astrozytom 7 Jahre nach Operation des Aesthesioneuroblastoms. Die klinischen Daten der Patienten sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Die histologische Diagnose wurde am HE-Schnitt sowie durch die Beurteilung immunhistochemischer Reaktionen auf Zytokeratin, S-100 Protein, Synaptophysin (Syn) und neuronspezifische Enolase (NSE) im Institut für Pathologie des Klinikums Fulda gestellt. Die Abbildungen 2A und B zeigen die entsprechenden histologischen Befunde. Darüber hinaus erfolgte ein Grading nach dem System von Hyams [1983]. Die Tumoren wurden entsprechend der Stadieneinteilung nach Kadish [1976] bzw. erweitert nach Morita et al. [1993] klassifiziert.

Von 12 Patienten lag in Paraffin eingebettetes Material vom Primärtumor, in 3 Fällen von Rezidiven und in 2 Fällen von mehreren Metastasen vor.

Tabelle 1. Klinisch-pathologische Daten des untersuchten Tumorkollektivs.

Nr.	Alter	Geschl.	Tumor	Stadium n. Morita	Grading n. Hyams	Operativer Zugang	Gesamtüberleben (Monate)	Rez.- u. meta.- freies Überleben	Tod am Tumor
1	38	m	PT	B	II	endonasal	29	29	
2	54	w	R	B	III	endonasal	26	26	
3	50	m	PT	C	IV	subfrontal	17	12	
4	16	w	PT	C	I	MD, OS	82	82	
5	22	w	PT	D	IV	LR, EO, ND	24	4	#
6	39	m	PT	B	-	MD	163	163	
7	33	m	PT	C	II	LR	84	84	an Zweit-Ca (Astrozytom)
8	43	w	PT	C	-	LR, OS	8	6	#
9	58	w	PT	C	III	LR, EO	13	2	#
10	59	m	PT	B	III	endonasal	25	25	
11	58	m	PT	C	IV	endonasal n. intrakran. Tu-Res.	1	1	#
12	82	m	R	B	IV	endonasal	38	38	
13	53	w	PT	A	-	endonasal	130	130	
14	56	w	PT	B	II	endonasal	37	37	
15	47	m	PT	C	-	LR	64	64	#
16	54	w	R	C	IV	LR, EO	3	1	#
17	72	m	PT	C	II	subfrontal	7	7	
18	74	m	PT	C	II	intrakraniell	1	1	Komplikation

PT = Primärtumor, R = Residualtumor, LR = laterale Rhinotomie, EO = Exenteratio orbitae, OS = osteoplastische Stirnhöhlenoperation, MD = Midfacial degloving, ND = Neck dissection; Intrakranielle Resektionen bezeichnen OP's durch Neurochirurgen.

Von den Tumoren der Patienten 1-5, 7, 9-11 und 16-18 lag Paraffinmaterial vor, das molekularzytogenetisch untersucht werden konnte.

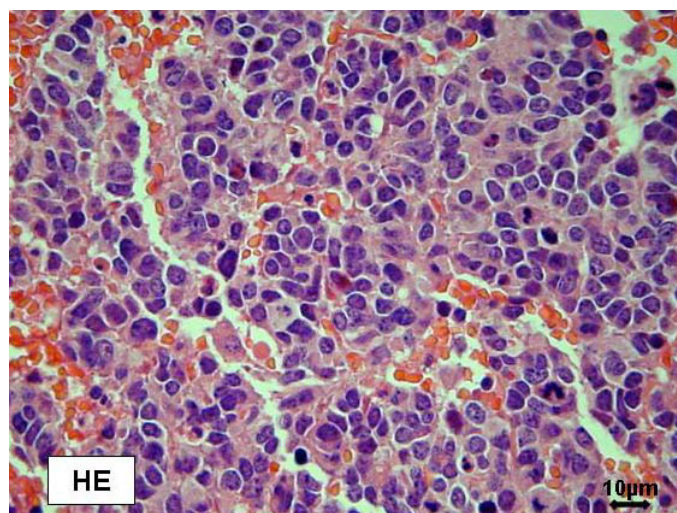


Abbildung 2A: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Aesthesioneuroblastoms; Lobuläre Anordnung gering differenzierter Neuroblasten (kleine, uniforme Zellen mit spärlichem eosinophilem Zytoplasma und runden bis ovalen hyperchromatischen Zellkernen mit reichlich Mitosen) ohne Neurofibrillen, separiert durch feines fibro-vaskuläres Stroma.

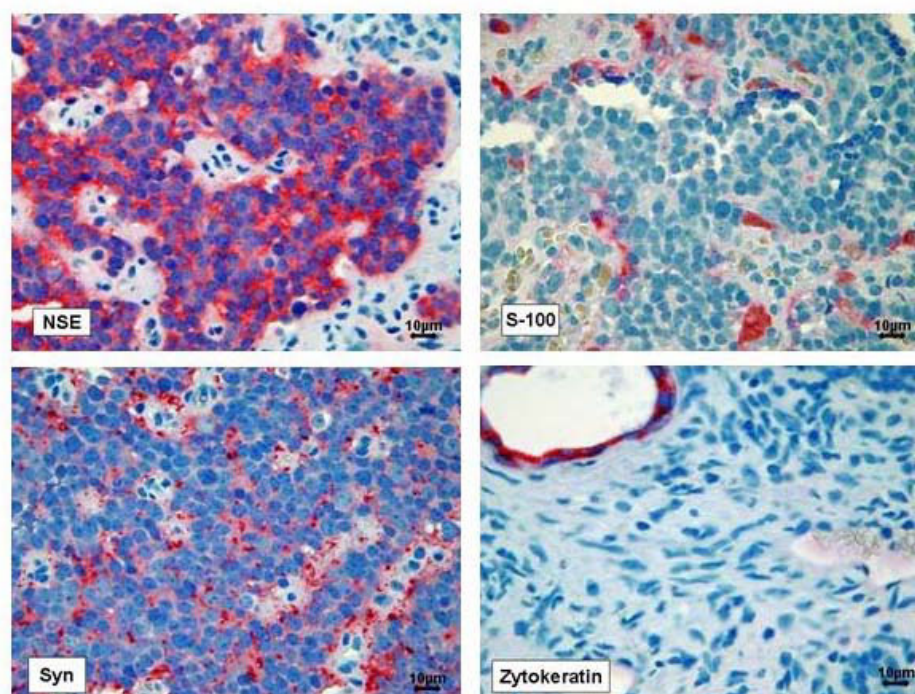


Abbildung 2B: Immunhistochemisches Muster eines Aesthesioneuroblastoms, positive Reaktion auf NSE, S-100 und Syn bei negativer Reaktion auf Zytokeratin.

3.2. Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH)

Die Vergleichende Genomische Hybridisierung (engl. "Comparative Genomic Hybridization", CGH) ist eine 1992 erstmals beschriebene molekularzytogenetische Methode, die es erlaubt, in einem Experiment einen Überblick über die gesamten chromosomalen und subchromosomalen Veränderungen eines Tumorgenoms zu erlangen [Kallioniemi et al. 1992]. Die CGH beruht auf der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Es werden die zu untersuchende Tumor-DNA und daneben normale DNA eines gesunden Probanden extrahiert, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und dann zu gleichen Teilen auf normale Metaphasenchromosomen, die aus Blutlymphozyten eines ebenfalls gesunden Probanden gewonnen werden, hybridisiert. Tumor- und Normal-DNA konkurrieren dabei um homologe Bindungsstellen auf den Chromosomen. Überwiegt im Tumor eine DNA-Sequenz, so bindet diese häufiger an die entsprechende chromosomale DNA, hat der Tumor hingegen DNA verloren, so bindet mehr Normal-DNA. Die genetischen Aberrationen eines Tumorgenoms werden somit als DNA-Gewinn (Überrepräsentierung, Amplifikation) oder DNA-Verlust (Deletion) erkennbar. Dies hat biologische Bedeutung, da eine Amplifikation auf die Aktivierung eines Proto-Onkogens, eine Deletion hingegen auf die Inaktivierung eines TSG hinweisen können. Um diese DNA-Veränderungen quantifizieren zu können, erfolgt die Auswertung nicht visuell sondern nach Aufnahme mit einer CCD-Kamera über ein Computersystem mit einem Programm zur digitalen Bildanalyse der Fluoreszenzbilder.

Die CGH wurde in Anlehnung an die Protokolle von Kallioniemi et al. [1992, 1994a] sowie du Manoir et al. [1993] durchgeführt. Die Einzelheiten der Protokolle sind publiziert [Bockmühl et al. 1996b, Petersen et al. 1996, Roth et al. 1997] und über die Internetseite (<http://amba.charite.de/cgh>) abrufbar. Die CGH umfasst folgende Schritte: a) DNA-Extraktion, b) Metaphasen-Präparation, c) DNA-Markierung, d) Hybridisierung, e) DNA-Nachweis, f) digitale Bildverarbeitung und -auswertung.

DNA-Extraktion

Von dem in Paraffin eingebetteten Tumormaterial wurden jeweils ca. dreissig 5µm dicke Gewebeschnitte auf Objekträger aufgezogen. Der erste Schnitt wurde in Haematoxylin-Eosin gefärbt und mikroskopisch das Tumorareal markiert. Dieses wurde dann entsprechend von den anderen Schnitten mikrodisektiert und in 2ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach Entparaffinisierung mit Xylol erfolgte die DNA-Extraktion nach

Standardprotokoll [Wright & Manos 1990] bzw. auch nach dem Protokoll von Speicher et al. [1993]. Zuerst wurden die Proben zum Verdau in jeweils 900µl Digestionspuffer, bestehend aus 30mM Trispuffer (pH 8,5) + 1mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,0) + 0,5% Tween20 + Proteinase K (1mg/ml) über Nacht bei 50°C inkubiert. Daran schlossen sich die DNA-Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und die Fällung in Ethanol nach Standardprotokoll an [Sambrook et al. 1989]. Die Pellets wurden dann in Aqua bidest gelöst und ihre Konzentration mit einem Photometer bei 280nm bestimmt.

Die Normal-DNA wurde durch Blutentnahme von gesunden Spendern gewonnen. Nach Abtrennung der Leukozyten erfolgte die DNA-Extraktion wie oben beschrieben.

Metaphasen-Präparation

Die Präparation der Metaphasen erfolgte aus Blutlymphozyten gesunder Probanden, die in einer Kurzzeitkultur durch Phythämagglutinin zur Proliferation angeregt wurden. Nach Arretierung in der Metaphase mittels Colcemid erfolgte die Aufreinigung der Lymphozytenkerne über mehrere Waschschrte und das Auftropfen der Kerne auf gereinigte Objektträger (Verma & Babu 1994). Kurz vor der eigentlichen Hybridisierung wurden die Objektträger mit den Metaphasenchromosomen in 70%igem Formamid/2xSSC (pH 7,5) bei 78°C für 60-90 Sekunden denaturiert und danach jeweils 3 Minuten in einer eiskalten aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert.

DNA-Markierung

Die Markierung der DNA erfolgte über eine Nick-Translation, wobei die Tumor-DNA mit Biotin-16-dUTP (Boehringer, Mannheim, FRG), die Normalgewebs-DNA mit Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer, Mannheim, FRG) nach Standardprotokoll (Sambrook et al. 1989) markiert wurden. Die Größe der entstandenen Fragmente wurde mittels eines 2%igen Agarosegels überprüft. Nach Erreichen der optimalen Länge von 300 bis 700 Basenpaaren wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5µl EDTA (pH 8,0) und 2,5µl SDS (20%) gestoppt. Die Markierungseffizienz wurde in regelmäßigen Abständen mit einem einfachen Dot Blot und anschließender Farbreaktion überprüft.

Hybridisierung

Die Fällung von jeweils 5µg markierter Tumor- und Normalgewebs-DNA, 20µg Cot1-DNA (Gibco BRL, Life Technologies, Paisly, UK) und 1µg Heringssperma-DNA erfolgte

in 3-fachem Volumen absolutem Ethanol und 0,3M Natriumacetat bei -80°C für ca. 30 Minuten. Nach Zentrifugation bei +4°C und 14 000rpm für 30 Minuten, Dekantieren des Überstandes und Trocknen des Pellets wurde dieses für 30 Minuten bei 37°C in 5µl deionisiertem Formamid gelöst. Danach wurden 10µl Mastermix (20% Dextransulfat/4xSSC) zugegeben und das Gemisch für 5 Minuten bei 77°C denaturiert. Anschließend erfolgte das "preannealing" (Hybridisierung repetitiver Sequenzen) bei 37°C für 1 bis 2 Stunden.

Zwölf µl einer Probe wurden jeweils auf einen der vorbereiteten Objektträger aufgetragen, durch ein 18 x 18mm Deckglas bedeckt und mit Fixogum luftdicht sowie blasenfrei abgeschlossen. Die Hybridisierung erfolgte bei konstant 37°C für 3 Tage [Kallioniemi et al. 1994a].

Die Tumor-DNA wurde überwiegend geschlechtsneutral hybridisiert, d.h. bei einem Tumor von einem männlichen Patienten wurde die DNA mit männlicher Referenz-DNA und männlichen Metaphasenchromosomen präpariert bzw. bei weiblicher Tumor-DNA mit XX-Normal-DNA und XX-Metaphasenchromosomen.

DNA-Nachweis

Die Detektion erfolgte durch eine Bindung von Fluorescein-Avidin (FITC) an die Biotin-markierte Tumor-DNA und Anti-Digoxigenin-Rhodamin (TRITC) an die mit Digoxigenin markierte Normalgewebs-DNA. Zur Identifizierung der Chromosomen wurden diese mit 4,6-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) gefärbt [Verma & Babu 1994].

Nach der Hybridisierung erfolgten zunächst 3 Waschschrte für jeweils 3 Minuten mit Formamid/2xSSC (1:1, pH 7,0) bei 37°C, anschließend wiederum dreimal jeweils 3 Minuten mit 0,1xSSC bei 60°C. Danach wurden die Präparate kurz in 4xSSC/0,2% Tween20 getaucht und dann mit 3% BSA in 4xSSC/0,2% Tween20 für 20 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert (Blocking-Schritt). Nach einem erneuten kurzen Waschschrte mit 4xSSC/0,2% Tween20 wurden pro Objektträger FITC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 1:200 und TRITC (Boehringer, Mannheim, FRG) 1:100 in 3% BSA in 4xSSC/0,2% Tween20 aufgetragen, mit einem Deckgläschen bedeckt und für 30 Minuten abgedunkelt in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Objektträger wiederum dreimal jeweils 3 Minuten in 4xSSC/0,2% Tween20 bei 45°C gewaschen bevor sie mit DAPI (0,2mg/ml, 1:5000) für 5 Minuten bei Raumtemperatur gegengefärbt wurden. Abschliessend wurden die Präparate mit Aqua dest. gespült und mit Antifading (DABCO) eingedeckt.

Digitale Bildverarbeitung und -auswertung

Die Bildaquirierung wurde an einem Zeiss Axiophot Epifluoreszenzmikroskop (Plan NEOFLUAR Öobjektiv x63, N.A. 1.25, Zeiss, Oberkochen, FRG) durchgeführt. Es wurden folgende Filter verwendet: DAPI - Zeiss Filter-Set 02 Ausführung G365, Beamsplitter FT 395, Emission LP 42; FITC - Zeiss Filter-Set 10, Ausführung BP 450-490, Beamsplitter FT 510, Emission BP 515-565; TRITC - Chroma Filter-Set plus Ausführung Zeiss-Filter-Set 15, Ausführung BP 546/12, Beamsplitter FT 565, Emission BP 570-650. Pro Fall wurden 10 bis 15 Metaphasen ausgewählt. Von jeder Metaphase wurden drei monochrome Bilder (entsprechend den Fluorochromen) aufgenommen. Die Bildaufnahme erfolgte über eine mit einem Mikroskop verbundene CCD-Kamera (Photometrics, Tucson, AZ). Die FITC-, TRITC- und DAPI-Fluoreszenzsignale wurden jeweils separat als 8-bit Graustufenbilder (256 Graustufen) digital kodiert und im TIFF-Format abgespeichert. Die digitale Bildauswertung erfolgte anhand einer CGH-Software, die auf der Grundlage des AMBA-Systems und des Karyotypisierungsmoduls KARYOTYP (IBSB GmbH, Berlin, FRG) entwickelt und auf einem Pentium PC unter Windows implementiert wurde (Roth et al., 1997). Die drei Fluoreszenzbilder einer Metaphase und der erste Schritt der Bildauswertung sind beispielhaft in Abbildung 3 veranschaulicht.

Aus der Übereinanderlagerung des FITC- und TRITC-Bildes, der Normierung der Fluoreszenzintensitäten und dem Vergleich der korrespondierenden Bildpunkte resultiert das sog. RATIO-Bild. Es gibt die DNA-Veränderungen anhand von Fehlfarben wieder. Ein DNA-Gewinn (Überrepräsentierung, Amplifikation) im Tumor gegenüber dem Normalgewebe ist grün und ein DNA-Verlust (Deletion) rot gefärbt, während ein Gleichgewicht beider Genome blau dargestellt ist.

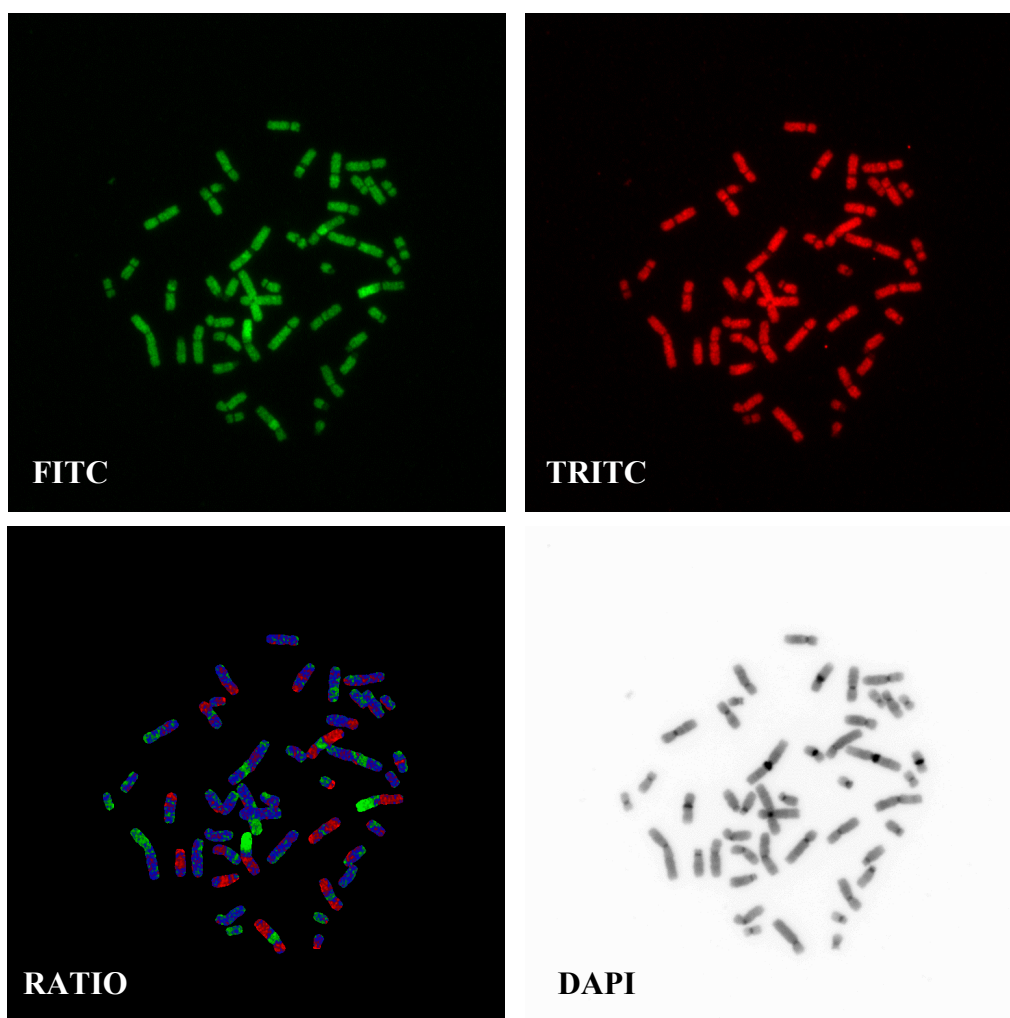
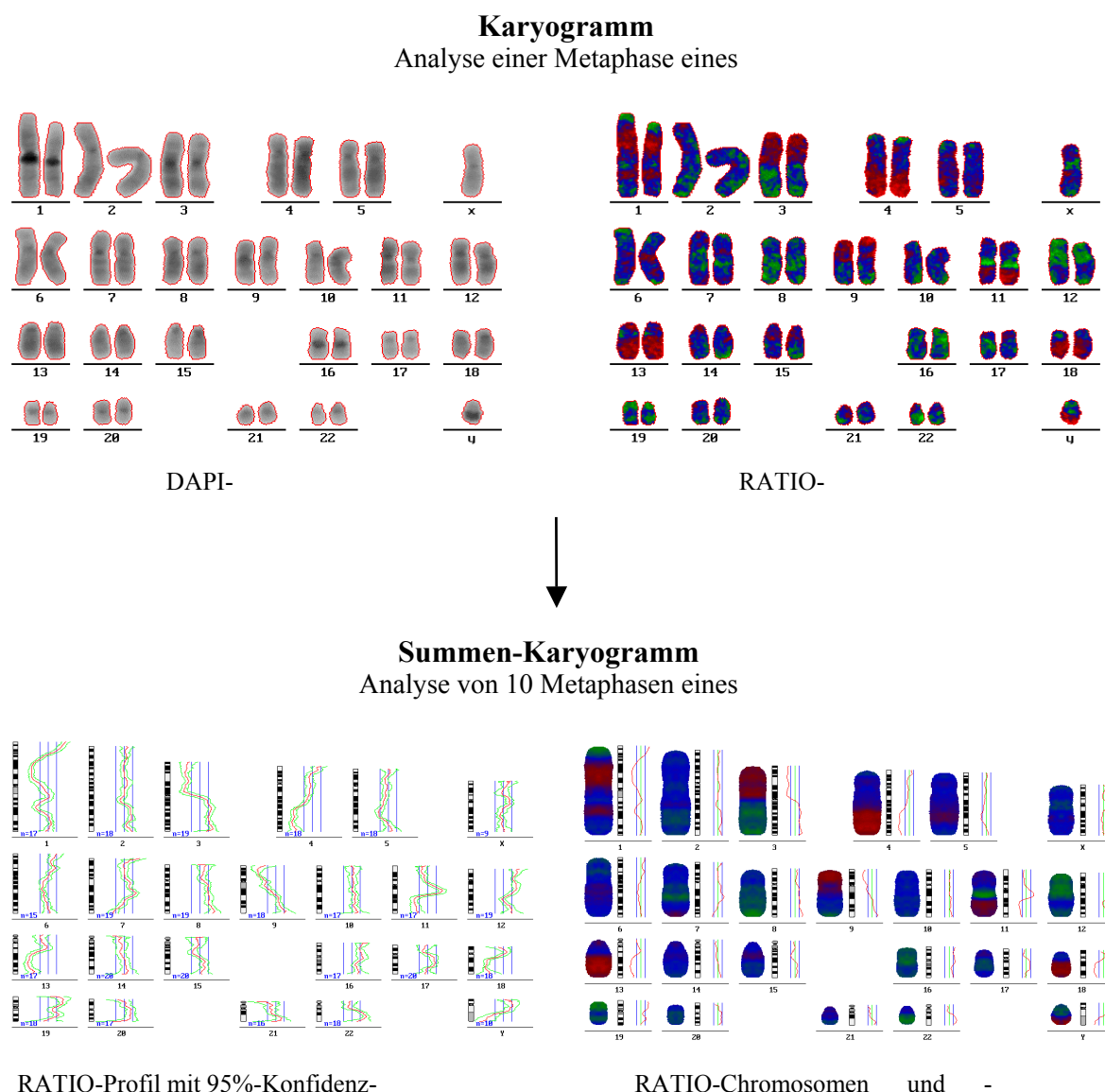


Abbildung 3: Erster Schritt der Bildverarbeitung.

Nach Identifizierung der Chromosomen anhand des DAPI-Bildes werden die Chromosomen jeder Metaphase in ein Karyogramm sortiert. Pro Fall werden dann die Karyogramme von mindestens 10 Metaphasen zu einem Summen-Karyogramm gemittelt. Dadurch können zufällige Fehler und Rauscheffekte minimiert werden. Neben den Chromosomen-Ideogrammen sind die DNA-Veränderungen als Profile angegeben. Die mittlere der drei Linien verdeutlicht das Gleichgewicht zwischen Tumor- und Normal-DNA, während die linke bzw. rechte Linie dem theoretischen Wert für eine Mono- bzw. Trisomie in 50% der Tumorzellen eines diploiden Tumors entsprechen. Die Sensitivität der Methode lässt die Detektion von Deletionen bis zu 10 Megabasen und Amplifikationen bis 2 Megabasen Größe zu. Diese Auswertungsschritte sind in der nachfolgenden Abbildung 4 wiedergegeben.



Die chromosomalen Imbalancen der Einzelfälle lassen sich auch in Form einer Strichdarstellung verdeutlichen (siehe Abbildung 5).

Die statistische Analyse von Tumorguppen erfolgt durch die Berechnung bzw. Erstellung eines Histogramms. Dazu werden von jedem Einzelfall die Imbalancen in den RATIO-Profilen mit dem Student-t-Test auf 95%ige und/oder 99%ige Signifikanz geprüft. Das CGH-Histogramm der Tumorgruppe repräsentiert dann die Anzahl der Fälle, die an einer gegebenen chromosomalen Region eine signifikante Veränderung aufweisen, normiert über die Gesamtzahl der Fälle dieser Tumorgruppe. Daraus ergibt sich die Verteilung der Imbalancen in Form einer Inzidenzkurve zu beiden Seiten der Chromosomenideogramme, wobei Ausschläge links Deletionen und rechts Amplifikationen entsprechen (Abbildung

6). Die Inzidenz lässt sich dann anhand von Hilfslinien ablesen; der Maximalwert von 100% wird erreicht, wenn alle Tumoren an einer bestimmten chromosomalen Region die gleiche Alteration aufweisen.

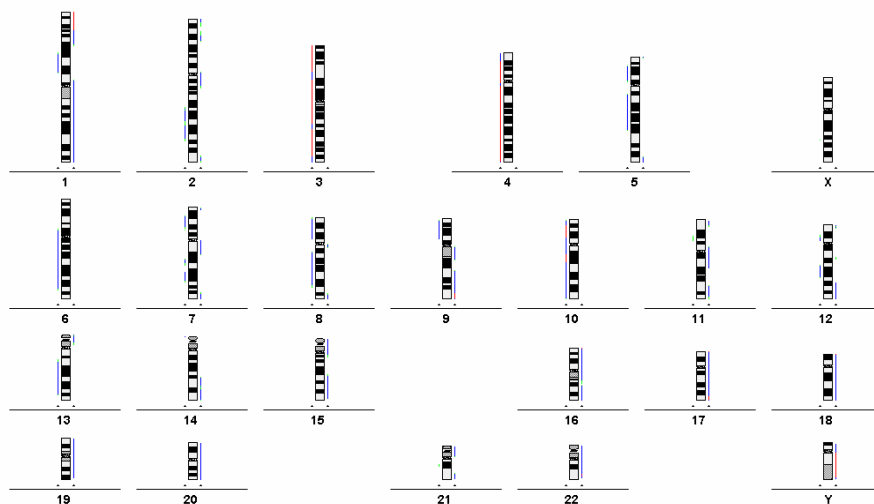


Abbildung 5: Imbalancen eines Einzelfalls in Form einer Strichdarstellung (blaue Striche=99%, grüne Striche=95% Signifikanz im Student-t-Test, rote Striche=besonders deutliche Deletionen bzw. Amplifikationen mit RATIO-Werten von $< 0,5$ resp. $> 1,5$).

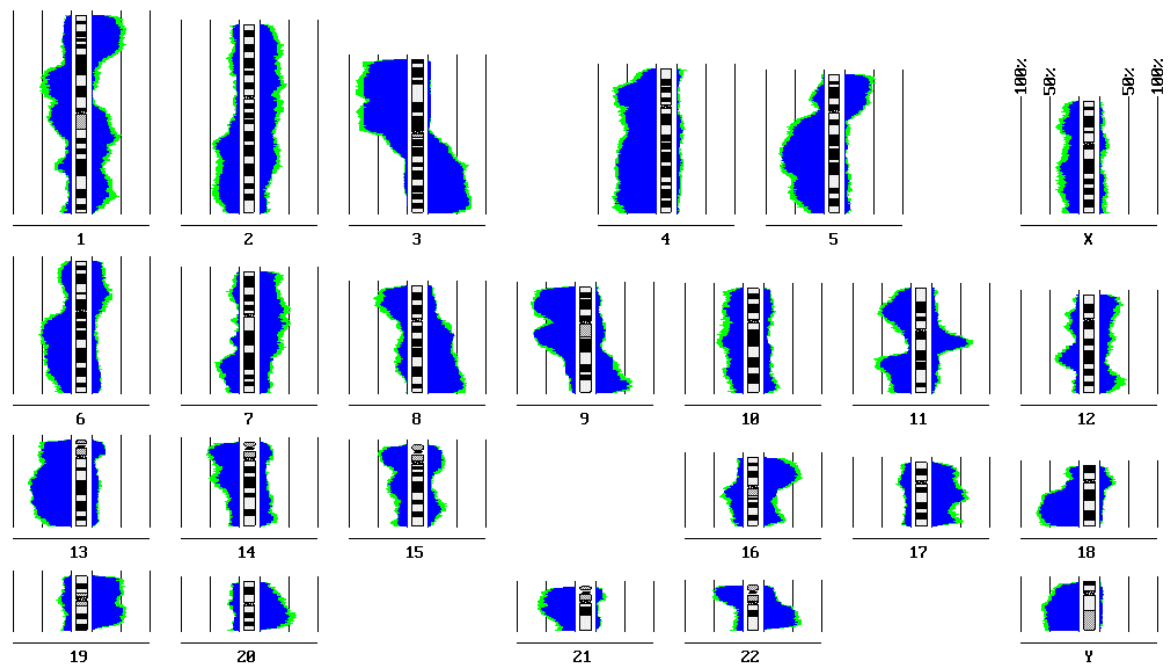


Abbildung 6: Histogramm einer Tumorgruppe (blaue Bereiche=99%, grün=95% signifikante Imbalancen).

4. ERGEBNISSE

4.1. Klinisch-pathologische Auswertung der untersuchten Aesthesioneuroblastome

Alle Patienten wurden primär operiert und adjuvant stereotaktisch bestrahlt. In keinem Fall wurde eine Chemotherapie eingesetzt. Operative Zugangswege waren dabei bis 1995 in 3 Fällen die laterale Rhinotomie bzw. bei 2 Patienten das Midfacial degloving, z.T. ergänzt durch eine osteoplastische Stirnhöhlenoperation. Seit 1995 wurde in der HNO-Klinik des Klinikums Fulda ein neues Konzept der chirurgischen Therapie erarbeitet. Entsprechend diesem wurden die Aesthesioneuroblastome der Stadien A und B ausschliesslich endonasal operiert. Dabei erfolgten jeweils die radikale mikro- und endoskopisch kontrollierte Sphenoethmoidektomie, ggf. beidseits unter Resektion des oberen Septums, um einen ausreichenden Sicherheitsabstand einzuhalten, was mittels Schnellschnitt-Diagnostik gesichert wurde. Diese Technik erlaubte es, die Frontobasis übersichtlich darzustellen und im Bedarfsfall das Siebbeindach sowie befallene Duraanteile ebenso zu reseziieren wie Lamina papyracea und Periorbita. Die Abbildungen 7 und 8 zeigt die prä- und postoperativen MRT-Befunde sowie die endoskopischen Befunde endonasal entfernter Aesthesioneuroblastome. Während die Tumoren der Stadien C und D ohne Orbitabefall über einen subfrontalen Zugang exstirpiert wurden (siehe Abbildung 9), wurden die Malignome des C- bzw. D-Stadiums, die die Periorbita durchbrochen und die Orbita ausgedehnt infiltriert hatten, über eine laterale Rhinotomie in Kombination mit der Exenteratio orbitae reseziert.

Von den hno-chirurgisch behandelten 17 Patienten haben 8 Patienten mindestens 2 Jahre rezidivfrei überlebt. Ein Patient stellte sich 12 Monate postoperativ mit gesicherten Hirnmetastasen vor, die neurochirurgisch entfernt werden konnten, so dass er derzeit wieder tumorfrei ist. Da ein Patient erst Ende 2001 operiert wurde, kann er noch nicht in die Verlaufsbeobachtung einbezogen werden. Die Tabelle 2 zeigt die Verteilung entsprechend des Stagings und Gradings. Darin spiegelt sich die prognostische Bedeutung des Stagings nach Morita wieder, d.h. je ausgedehnter der Tumor ist, desto grösser ist auch die Wahrscheinlichkeit, am Tumor zu versterben, auch bei in-sano-Resektion. Von den 6 überlebenden Patienten mit Aesthesioneuroblastomen des Stadiums B wurden fünf endonasal mikro-endoskopisch kontrolliert reseziert. Hierin zeigt sich die Berechtigung, diesen schonenden operativen Zugang auch für die Resektion maligner Tumoren einzusetzen.

Bezüglich des Gratings wird lediglich die Tendenz deutlich, dass bei den Graden III und IV schlechtere Prognosen wahrscheinlicher sind.

Tabelle 2. Auswertung des Überlebens in Bezug auf Staging nach Morita und Grading nach Hyams.

Staging	Überlebende Patienten (n=10)	am Tumor Verstorbene (n=6)
A	1	/
B	6	/
C	3	5
D	/	1

Grading	(n=8)	(n=5)
I	1	/
II	3	1
III	2	1
IV	2	3



Abbildung 7: (A) Präoperative koronare MRT in T2-Wichtung bei einem Aesthesioneuroblastom Stadium B nach Morita. (B) Postoperative koronare MRT in T2-Wichtung desselben Patienten 2 Jahre nach endonasaler Tumorresektion und adjuvanter stereotaktischer Radiatio.

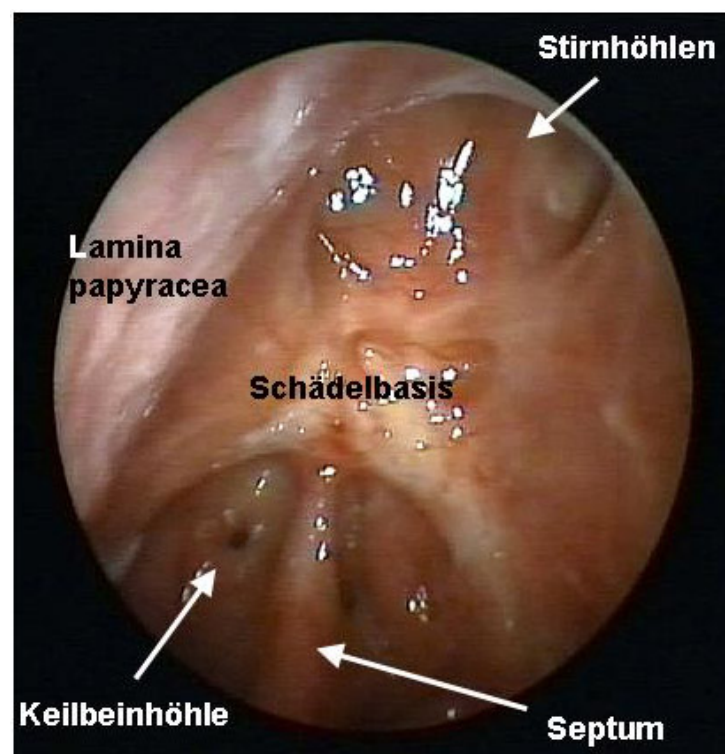
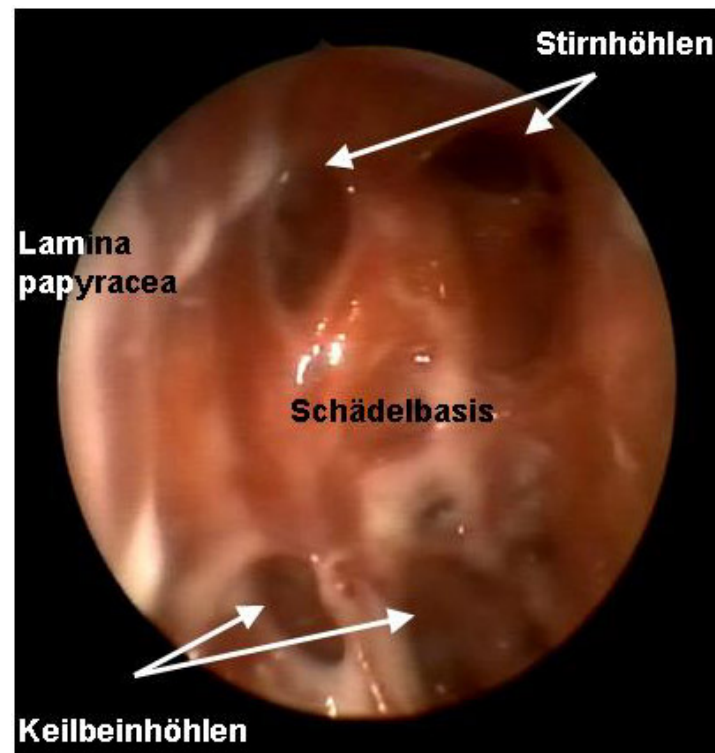


Abbildung 8: Endoskopie der Nasenhaupthöhle bzw. Nasennebenhöhlen 1 Jahr (**oben**) bzw. 3 Jahre (**unten**) nach endonasaler Resektion eines Aesthesioneuroblastoms.

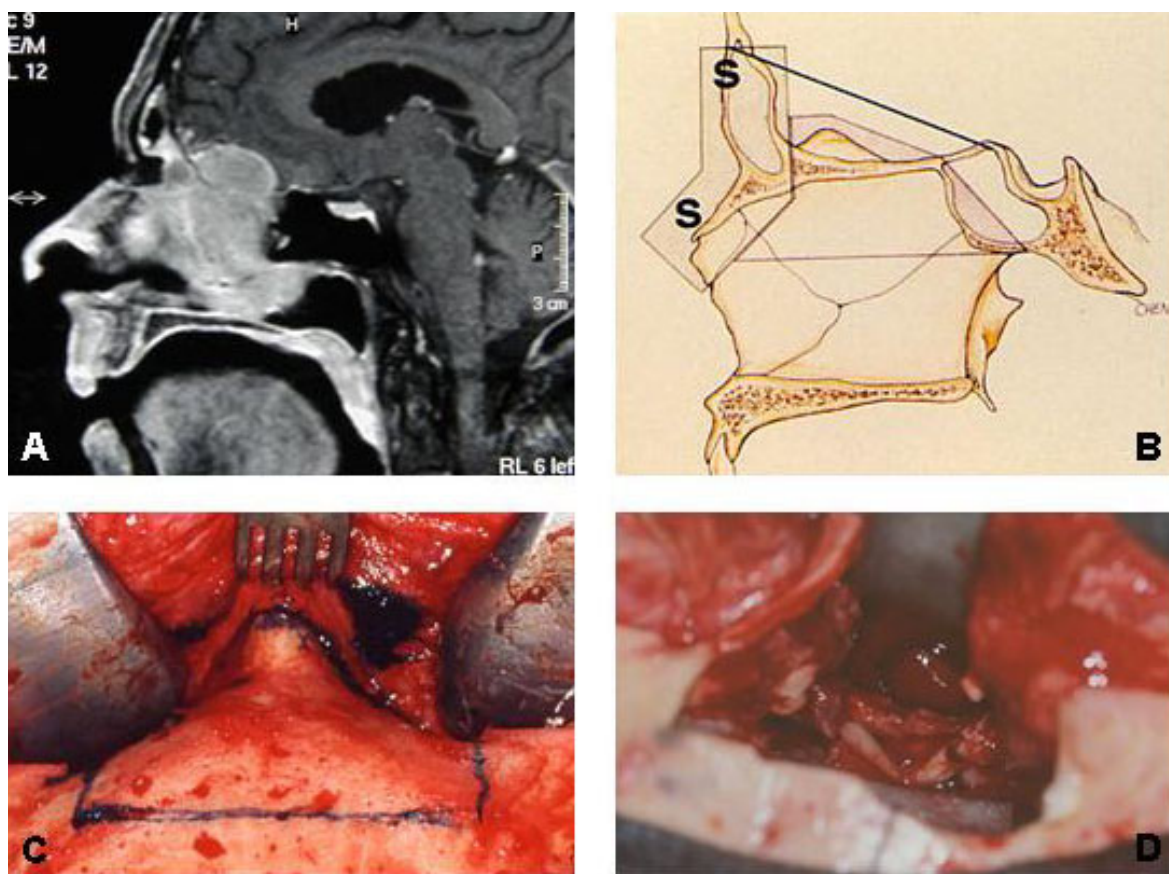


Abbildung 9: (A) Präoperative saggitale MRT in T2-Wichtung bei einem Aesthesioneuroblastom Stadium C. (B) Schematische Darstellung des subfrontalen Zuganges [Raveh et al. 1993], der zur Exstirpation eines Tumors dieser Ausdehnung als operativer Zugang der ersten Wahl benutzt werden sollte. (C) Markierung der Osteotomien bzw. des temporär zu entfernenden Knochenblockes für den subfrontalen Zugang. (D) Darstellung des Chiasma opticum als dorsale Resektionsgrenze des subfrontalen Zuganges.

Die Resektion der Aesthesioneuroblastome und auch anderer Malignome der vorderen Schädelbasis sollte unserer Meinung ausschliesslich über die nachfolgenden operativen Zugänge durchgeführt werden:

- Endonasale Resektion
- Midfacial degloving (bei weit lateraler Tumorausbreitung) [Berghaus 1991]
- Subfrontaler Zugang (bei Berührung des Gehirns) [Raveh et al. 1993]

Eine Indikation zur lateralen Rhinotomie [Moure 1922] sehen wir heute im Allgemeinen nur noch bei der Notwendigkeit der simultanen Exenteratio orbitae [Draf & Samii 1989].

4.2. Molekularzytogenetische Charakterisierung der Aesthesioneuroblastome als Tumorentität

Aufgrund des sehr seltenen Auftretens der Aesthesioneuroblastome gibt es bisher keine Studien über die molekulargenetischen Veränderungen dieser Tumorentität, so dass dies die erste Untersuchung dazu ist.

Die Primärdaten der CGH-Analyse sämtlicher Einzelfälle, einschliesslich ihrer Summenkaryogramme und RATIO-Profile sowie klinikopathologischer Parameter, sind über die Online CGH Tumor Database von der Internetseite <http://amba.charite.de/cgh> abrufbar.

Abbildung 10 zeigt die Zusammenfassung aller chromosomalen Veränderungen der 22 analysierten Aesthesioneuroblastome (Primär- und Rezidivtumoren sowie Metastasen) in Form eines Histogramms. Die blauen Inzidenzbereiche geben den Prozentsatz der chromosomalen Veränderungen an, die mit einer Signifikanz von 99% auftreten, der grüne Saum kennzeichnet die Inzidenz mit 95%iger Signifikanz. Rote Markierungen nehmen schliesslich Bezug auf den prozentualen Anteil besonders deutlicher Deletionen und Amplifikationen mit RATIO-Werten von $< 0,5$ resp. $> 1,5$. Links der Chromosomenideogramme sind DNA-Verluste, rechts DNA-Überrepräsentierungen dargestellt. Die Zentromerbereiche sind aufgrund der Interferenz mit kompetitiven DNA-Sequenzen von der Auswertung ausgeschlossen.

In jeweils mindestens der Hälfte aller analysierten Proben treten Deletionen im Bereich der chromosomalen Arme 1p, 2q, 3p/q, 4p/q, 5p/q, 6q, 8p/q, 9p, 10p/q, 11p, 12q, 13q, 18q und 21q auf. Dabei zeigen sich häufig DNA-Verluste ganzer Chromosomen: in 16 Fällen des Chromosoms 4, Chromosom 10 in 15 Fällen, 13x Chromosom 3 und 9x Chromosom 5. Zu finden sind auch häufig Deletionen, die sich auf einen gesamten Chromosomarm erstrecken: in 7 Fällen betrifft das 18q, in 5 Fällen 13q und in 4 Fällen 6q. Gipfel der Inzidenzkurve markieren die Regionen 1p21-p31, 3p13-p14, 3p21-p23, 3q13, 4p14-p15, 5p14, 8p21, 8q21, 8q23, 9p21-p23, 11p14, 12q21, 14q21 und 21q21. Besonders deutliche DNA-Verluste (rote Markierungen im Histogramm der Abbildung 10) sind häufig im Bereich der chromosomalen Regionen 3p12-p13, 3p22, 3p26, 3q13, 3q24-q25, 4p13-p15, 4q sowie der Banden 13q21-q23 nachweisbar.

Das X- bzw. Y-Chromosom muss aus der Bewertung ausgeschlossen werden, da häufig nicht geschlechtsneutral hybridisiert werden konnte.

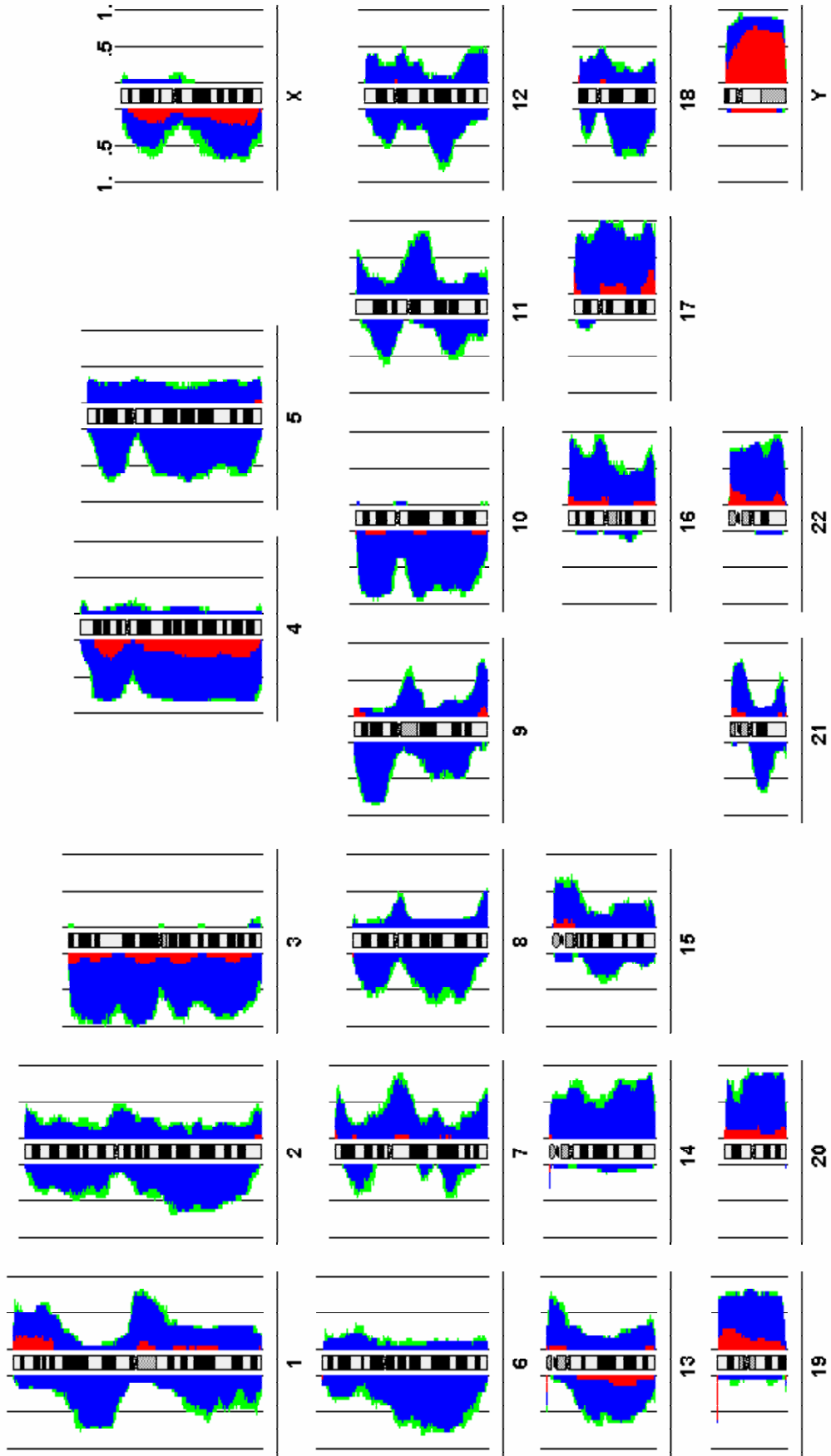


Abbildung 10: Histogramm über alle genetischen Alterationen in 22 Aesthesioneuroblastomen

Die häufigsten DNA-Überrepräsentierungen zeigen sich im Bereich von 1p, 7q, 9q, 11q, 14q, 16p/q, 17p/q, 19p/q, 20p/q und 22p/q. DNA-Zugewinne ganzer Chromosomen finden sich oft für die Chromosomen 19 (in 17 Fällen), 22 (in 12 Fällen) und 17 (in 11 Fällen). Amplifikationen kompletter Chromosomarme sind häufig für Chromosom 20q (in 8 Fällen), 1q, 16p und 17q (in jeweils 4 Fällen) zu beobachten. Inzidenzpeaks kennzeichnen die Regionen 7q11.2, 8qter, 9q34, 11q12-13, 16p11, 16pter, 16qter, 17q21, 17q24-q25 und 20q12-13.1. Sehr ausgeprägte DNA-Zugewinne, high-copy-Amplifikationen, treten häufig bei 1p33-p36, 17q11-q21, 17q24-q25 sowie Chromosom 19 und 20 auf.

Nur sehr vereinzelt liegen sog. Isochromosomen vor, d.h. Deletionen eines gesamten Chromosomarmes treten in Kombination mit einem DNA-Zugewinn des vollständigen korrespondierenden Chromosomarmes auf (z.B. in 3 Fällen Isochromosom 17q).

Mit einem Mittelwert von 16 Aberrationen variiert die Anzahl der Einzelveränderungen der analysierten Aesthesioneuroblastome zwischen 8 und 27, wobei im Einzelfall in den meisten Tumoren weder DNA-Verluste noch DNA-Zugewinne quantitativ stark überwiegen.

Aufgrund der geringen Fallzahlen lassen sich noch keine statistischen Aussagen zur möglichen Bedeutung spezifischer chromosomaler Alteration für z.B. die Metastasierung oder die Prognose machen. Das gleiche gilt für die Korrelation zum Staging oder Grading.

4.3. Vergleich Primärtumor und Metastasen bzw. Rezidivtumor

Von 4 Primärtumoren wurden insgesamt 7 Metastasen und 2 Rezidivtumoren untersucht. Die Metastasen waren in einem Fall eine Knochenmetastase, 1 Lymphknotenmetastase, 3 Haut- und Weichteilmetastasen sowie 2 intraspinale Metastasen. Der Vergleich zwischen den Primärtumoren und ihren Metastasen bzw. Rezidiven erfolgte anhand der Strichdiagramme, indem die übereinstimmenden und differierenden Alterationen im Verhältnis zur Gesamtzahl der chromosomalen Veränderungen berechnet wurden. Die klonale Zuordnung von Primärtumor und Metastasen bzw. Rezidivtumoren wurde definiert, wenn das CGH-Muster der Alterationen in mehr als 50% übereinstimmte und/oder gleiche spezifische Amplifikationen auftraten. Bei allen 4 Patienten war diese Übereinstimmung, d.h. die Klonalität, nachweisbar. Der Prozentsatz der identischen Veränderungen liegt bei knapp 55% im Fall der Patienten N°3 und N°7. Die Tumoren der beiden anderen Patienten zeigen eine Übereinstimmung in 80,6% (Fall N°5) und 95% (Fall N°9). In den Abbildungen 11, 12 und 13 sind exemplarisch dazu die entsprechenden Strichdiagramme dargestellt. Darüber hinaus verdeutlichen die Summen-Karyogramme der einzelnen Tumoren der 3 Patienten (N°3, 5 und 9) die Klonalität der Malignome.

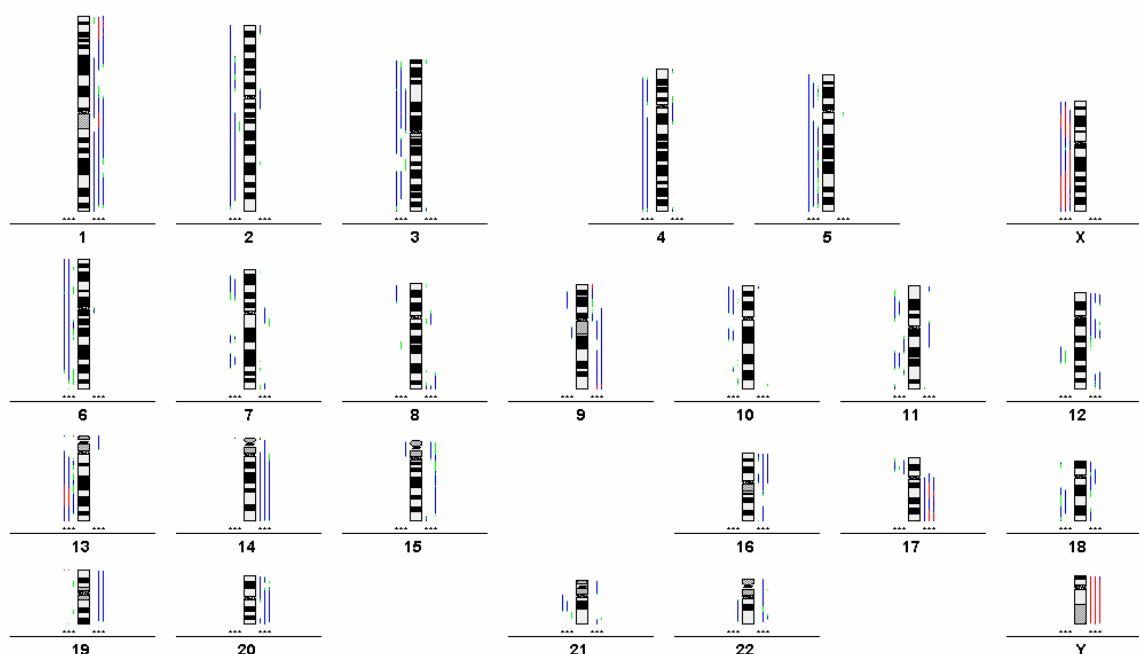
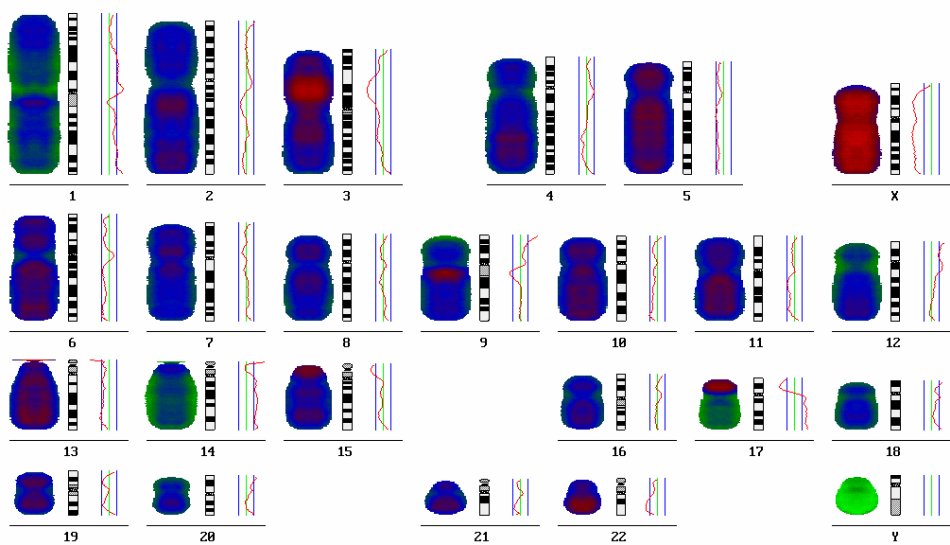
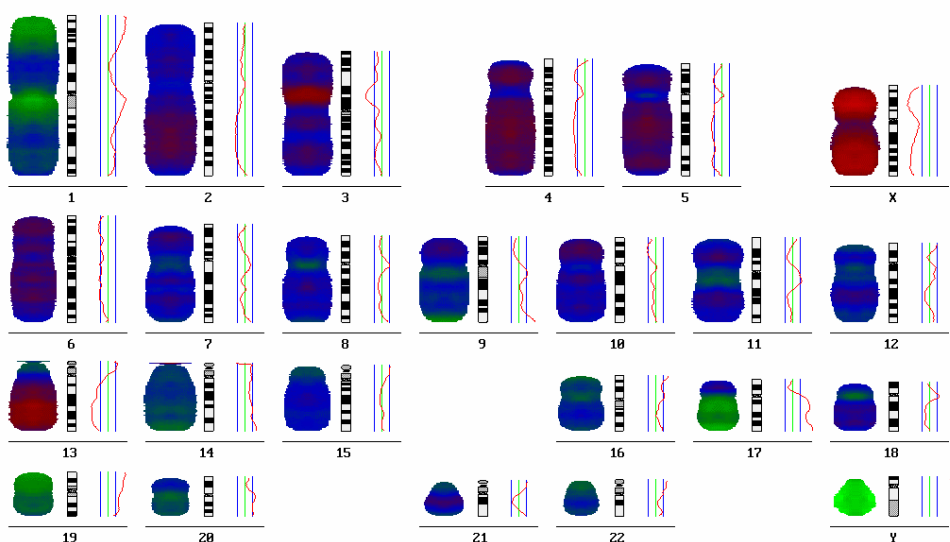


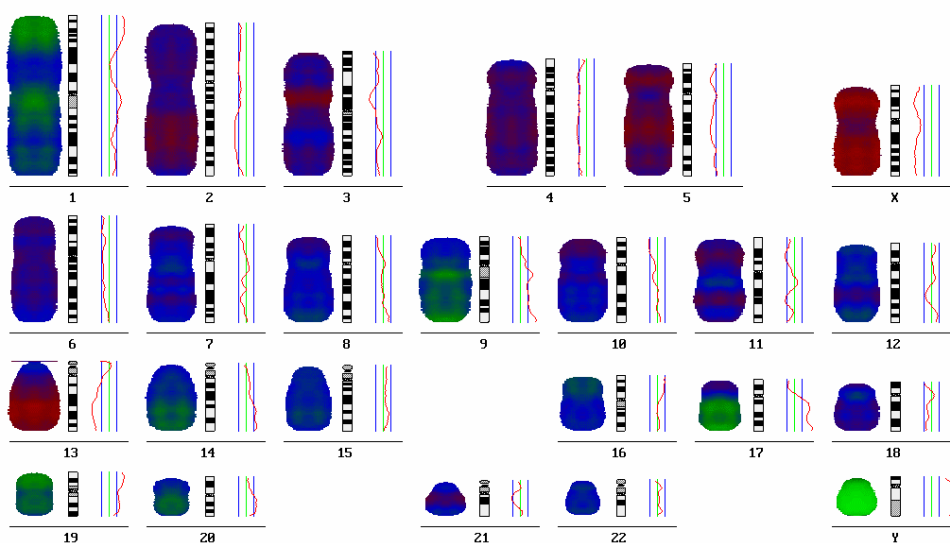
Abbildung 11: Vergleich der chromosomalen Alterationen des Primärtumors N°3 mit denen der synchronen Knochenmetastase sowie des 1 Jahr nach Operation entstandenen Rezidivs.



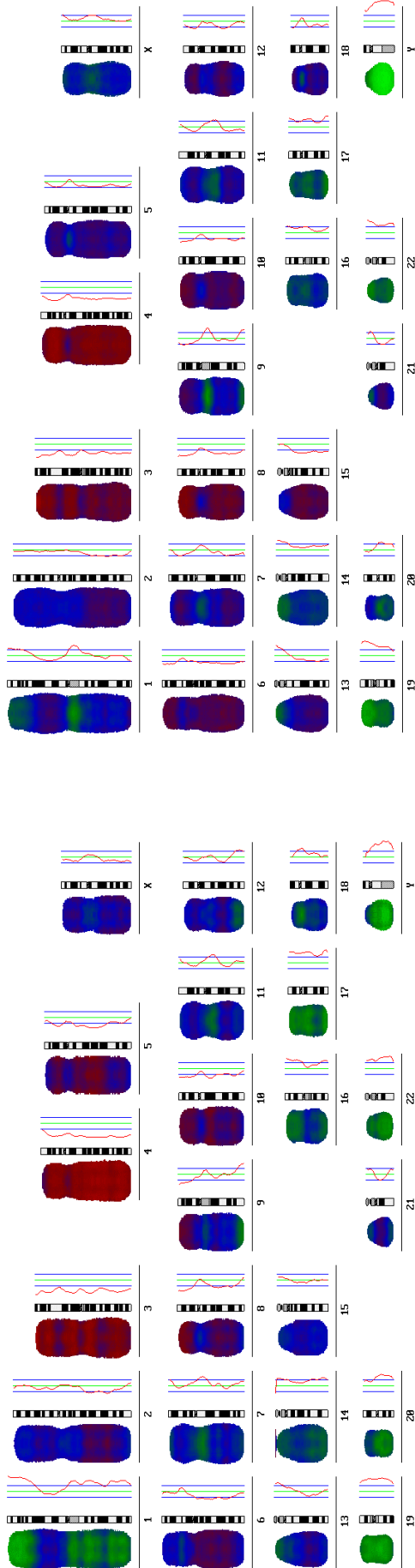
Primärtumor N° 3



Synchrone Knochenmetastase

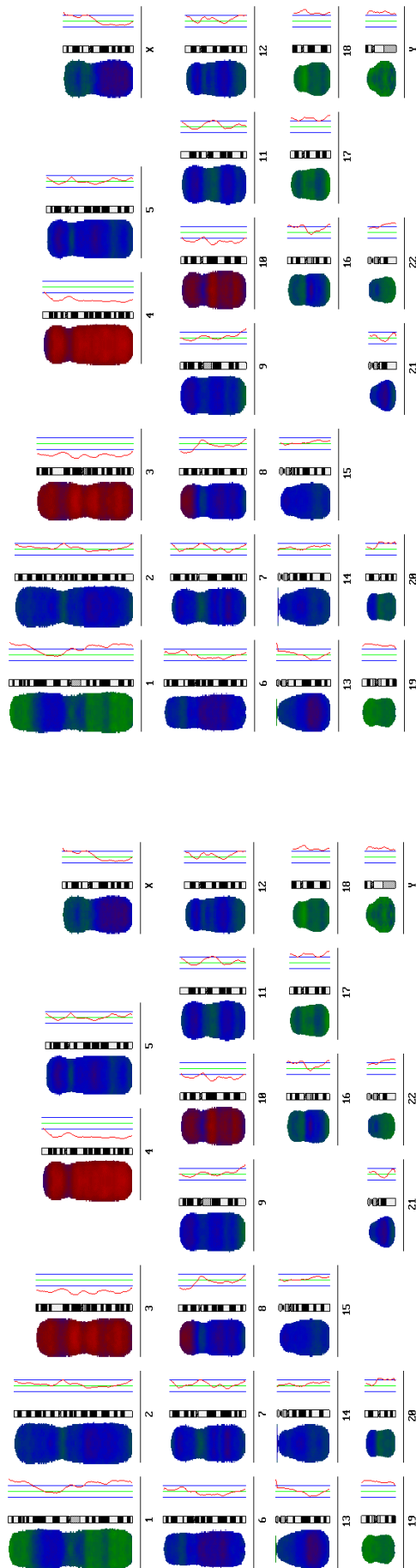


Rezidivtumor 1 Jahr postoperativ



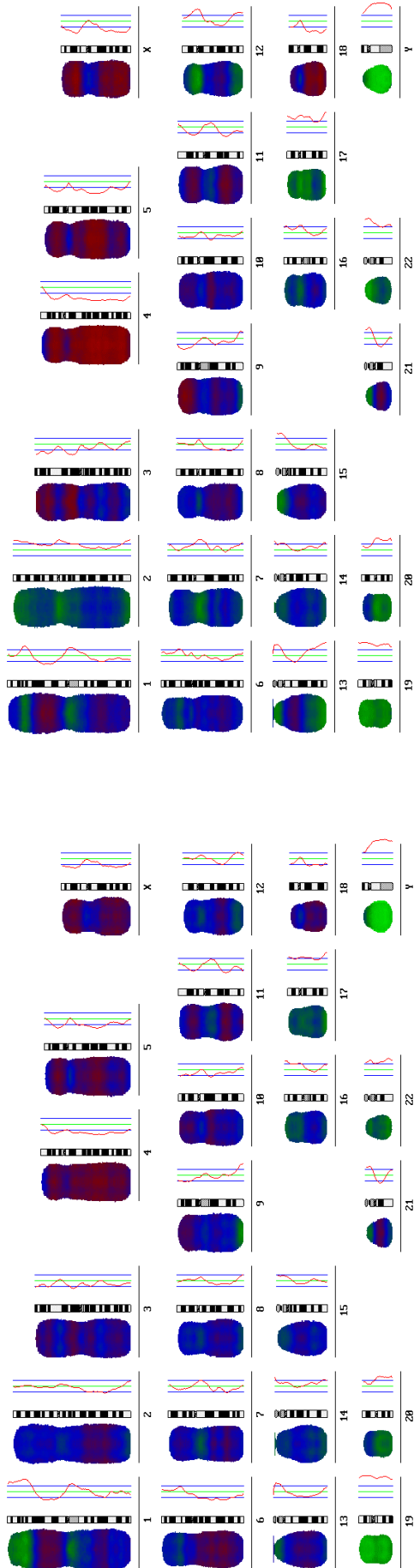
Primärtumor N° 5

Metachrone Weichteilmetastase



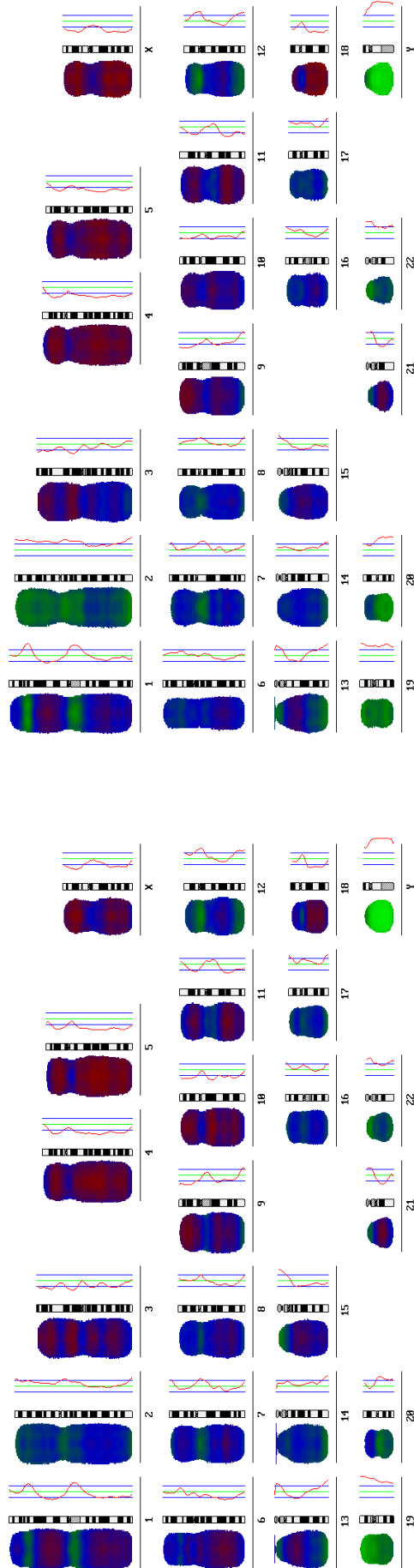
Metachrone Hautmetastase

Metachrone Hautmetastase



Primärtumor N° 9

Metachrone Lymphknotenmetastase



Metachrone intraspinale Metastase

Metachrone intraspinale Metastase

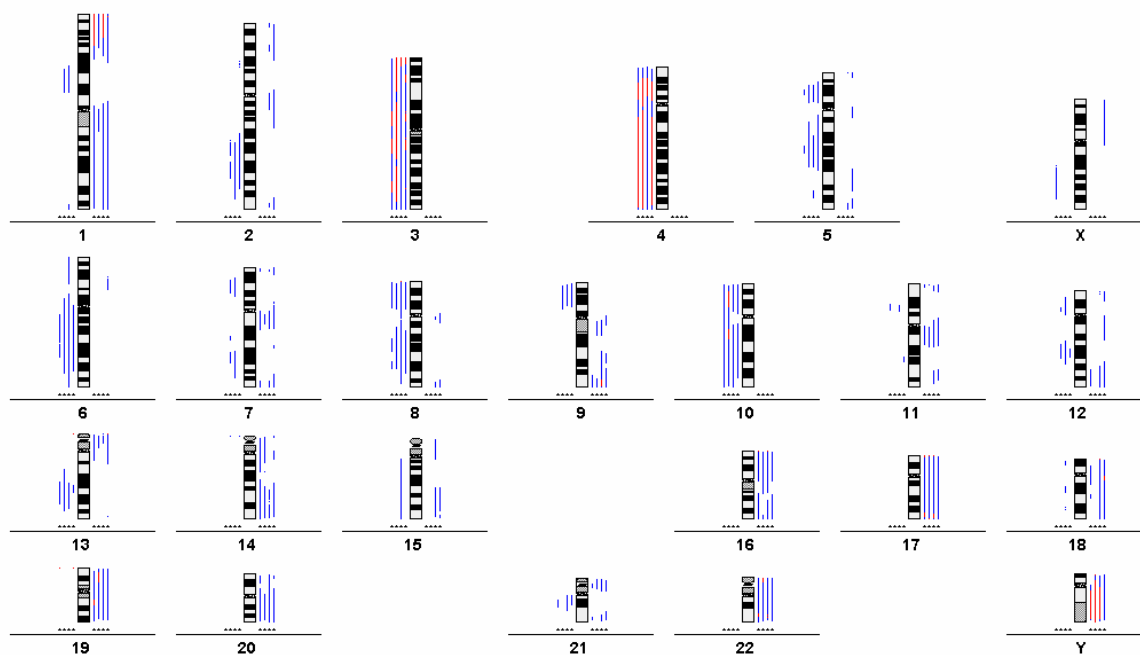


Abbildung 12: Vergleich der chromosomalen Alterationen des Primärtumors N°5 mit denen der metachronen Weichteil- bzw. Hautmetastasen.

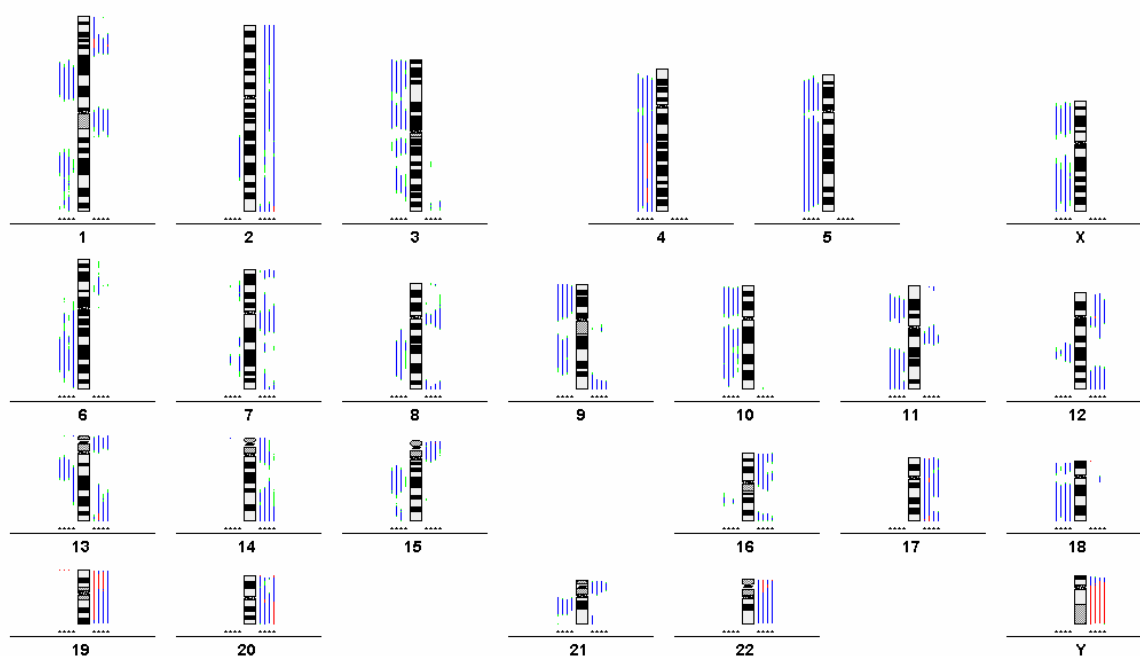


Abbildung 13: Vergleich der chromosomalen Alterationen des Primärtumors N°9 mit denen der synchronen Lymphknotenmetastase sowie der metachronen intraspinalen Metastasen.

5. DISKUSSION

5.1. Das Fuldaer Konzept der operativen Therapie maligner Tumoren der Frontobasis

An der HNO-Klinik des Klinikums Fulda besteht eine langjährige Erfahrung in der Behandlung und insbesondere der chirurgischen Therapie von Schädelbasistumoren [Draf & Samii 1989, Draf & Berghaus 1993, Draf & Schauss 1995]. Im Zeitraum vom 01.01.1987 bis 31.12.2001 wurden hier 331 Tumoren der Rhinobasis operiert [Draf et al. unveröffentlichte Daten]. In 66,8% (=221 Patienten) waren es benigne und in 33,2% der Fälle (=110 Patienten) maligne Tumoren [Draf et al. unveröffentlichte Daten]. Um die Malignome der Frontobasis unter Erhaltung eines Sicherheitsabstandes im Gesunden entfernen zu können wird von vielen Autoren heute immer noch die kranio-faziale Blockresektion als chirurgische Therapie der Wahl favorisiert [Bilsky et al. 1997, Donald 1994, Levine et al. 1994, Parsons et al. 1988, Resto et al. 1999]. Der breite Zugang durch das Mittelgesicht und die Frontobasis, der in der Regel über eine laterale Rhinotomie bzw. eine (erweiterte) Eröffnung nach Moure [1922] erfolgt, hat jedoch Nachteile [Draf & Schauss 1995]. Neben entstellenden Narbenbildungen und Deformitäten berichten einige Autoren in bis zu 26% der Fälle auch über die folgenden peri- und postoperativen Komplikationen: Persistierende Liquorfistel, Frontallappenabszess, Pneumatozephalus, subdurales Hämatom mit Superinfektion, Nekrose des frontalen Knochendeckels, frontale Mukozele, Tränengangstenose und unilaterale Erblindung [Chapman et al. 1981, Dulguerov et al. 1992, McCaffrey et al. 1994]. Um diese möglichen Komplikationen zu vermeiden und möglichst schonend zu operieren, werden seit ca. Mitte der 90er Jahre auch maligne Tumoren der vorderen Schädelbasis nur noch dann über extranasale Zugangswege operiert, wenn sie die Orbita und/oder die gesamte Stirnhöhle infiltriert und/oder die Dura durchbrochen und das Gehirn erreicht haben und/oder über die Fossa pterygoidea nach lateral gewachsen sind. Alle anderen Frontobasistumoren werden endonasal reseziert. Dieses Konzept spiegelt sich auch in den Tumorzahlen der HNO-Klinik des Klinikums Fulda wieder: Sechzig der 110 Malignome wurden über extranasale Zugangswege entfernt, d.h. in 15 Fällen über ein Midfacial Degloving, 10x subfrontal sowie 10x über eine laterale Rhinotomie mit Exenteratio orbitae, 18x durch Kombinationsoperationen oder andere Zugänge und nur in 7 Fällen über eine laterale Rhinotomie ohne Exenteratio orbitae [Draf et al. unveröffentlichte Daten]. Demgegenüber wurden 50 maligne Tumoren der frontalen

Schädelbasis ausschliesslich endonasal operiert, wozu auch die 6 Aesthesioneublastome dieser Studie zählen.

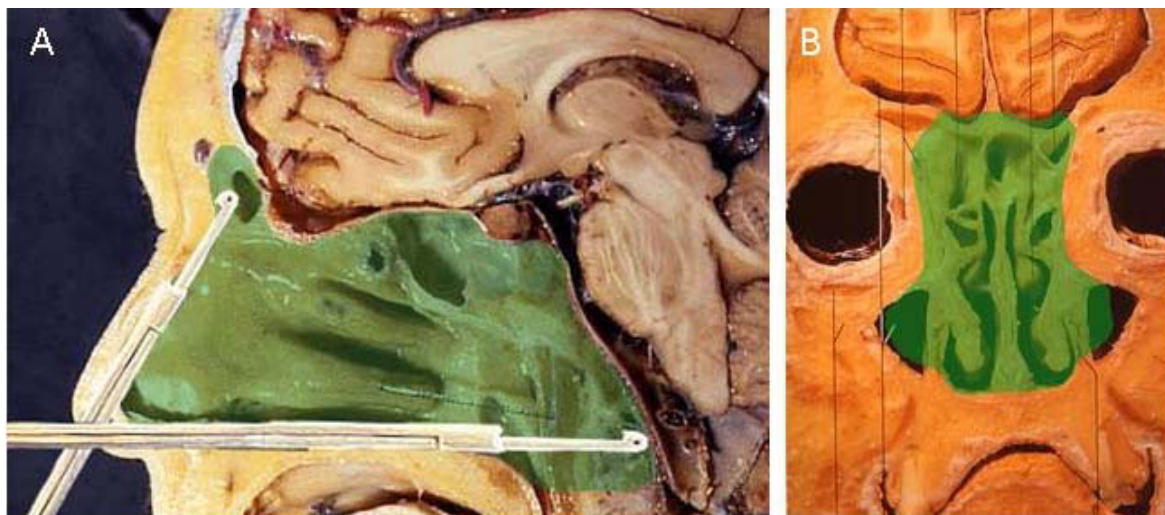


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Operationsfeldes (grün) bei endonasalen Operationen. Resektionsfeld im sagittalen (A) und frontalen (B) Schnitt.

Die Vorteile der endonasalen Tumorsektion sind

- A) die gute Übersichtlichkeit über das gesamte Siebbein, insbesondere das vordere Siebbein sowie die Keilbeinhöhle, wie in Abbildung 14 dargestellt;
- B) die Erhaltung der knöchernen Grenzen nach aussen (soweit onkologisch vertretbar), wodurch die Gefahr der Zellenbildung gering ist und bei Kindern Störungen am wachsenden Gesichtsschädel vermieden werden;
- C) dass Duradefekte von der unteren Stirnhöhlenhinterwand herab bis zur Mitte des Planum sphenoidale und seitlich bis zur Lamina papyracea von endonasal zuverlässig verschlossen werden können [Weber et al. 1996];
- D) dass sichtbare Narben und Gesichtsverziehungen vermieden werden, was auch für ein osteoplastisches Vorgehen über das Midfacial degloving bzw. den subfrontalen Zugang gilt.

Die limitierenden Faktoren der endonasalen mikrochirurgischen Tumorsektion sind die ausgedehnte Infiltration der Orbita, der Dura bzw. des Gehirns, welche einen offenen Zugang erfordern, wozu die endonasale Operation aber jederzeit erweitert werden kann. Das ist besonders wichtig, da die Ausdehnung der Periorbita- und Durainfiltration sowie

die Tumorausbreitung darüber hinaus präoperativ nicht immer exakt vorhergesagt werden können. Durch den kombinierten Einsatz von Mikroskop und Endoskop ist bei entsprechender Erfahrung die Differenzierung zwischen Tumor- und Normalgewebe möglich. Die präzise intraoperative Schnellschnittdiagnostik ist essentiell und sichert die in-sano-Resektion, auch wenn die Entfernung des Tumors bei der endonasalen Resektion oft nicht im Block sondern nur stückweise gelingt.

Die klinischen Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die endonasale minimal-invasive Resektion auch der Aesthesioneuroblastome möglich ist, aber sehr großer Erfahrung bedarf und deshalb Zentren vorbehalten bleiben sollte, die die Grenzen des mikro- bzw. endoskopischen Vorgehens kennen und im Bedarfsfall andere chirurgische Techniken anwenden können. Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich, sind alle an der HNO-Klinik des Klinikums Fulda primär endonasal operierten Aesthesioneuroblastome bisher rezidivfrei. Deshalb empfehlen wir dieses chirurgische Vorgehen für die Stadien A und B. Als einzige weitere Arbeitsgruppe berichten Walch et al. [2000] ebenfalls über die Möglichkeit der endonasalen Entfernung von Aesthesioneuroblastomen, wobei die Autoren z.T. auch die Operationen als endonasal klassifiziert haben, bei denen ein intrakranieller Tumoranteil durch den Neurochirurgen über eine bifrontale Kraniotomie reseziert wurde bzw. bei denen ein Residualtumor stereotaktisch bestrahlt wurde. Das resultiert daraus, dass in der Hälfte der Fälle der endonasale Zugang auch für die Resektion von Aesthesioneuroblastomen des Stadiums C gewählt wurde. Diese grossen Tumoren (Stadium C und D) empfehlen wir über einen subfrontalen Zugang zu entfernen, wodurch die Einhaltung eines Sicherheitsabstandes im Gesunden gewährleistet ist. Die Malignome des C- bzw. D-Stadiums, die die Orbita ausgedehnt infiltriert haben, sollten über eine laterale Rhinotomie in Kombination mit der Exenteratio orbitae reseziert werden. Für das Stadium D gilt die mögliche Kombination mit den entsprechenden Operationen zur Entfernung der Metastasen. Um die Prognose der Patienten zu verbessern halten auch wir eine postoperative adjuvante stereotaktische Radiatio für indiziert. Im Falle einer Duraplastik darf jedoch die Bestrahlung frühestens 8 Wochen postoperativ beginnen, um endokranielle Komplikationen zu vermeiden.

Dieses **neue** Fuldaer Konzept der operativen Sanierung von Aesthesioneuroblastomen und auch anderer Malignome der vorderen Schädelbasis ist nachfolgend nochmals zusammengefasst:

- **Endonasale Resektion**, wenn keine intrakranielle bzw. orbitale Tumordinfiltration vorliegt
- **Midfacial degloving**, bei weit lateraler Tumorausbreitung
- **Subfrontaler Zugang**, bei Infiltration des Gehirns
- **Laterale Rhinotomie nur** bei der Notwendigkeit der simultanen Exenteratio orbitae (bei orbitaler Tumordinfiltration)

5.2. Charakteristische chromosomale Alterationen der Tumorentität Aesthesioneuroblastom

Obwohl die Klassifikationen der Aesthesioneuroblastome nach Kadish et al. [1976] sowie die erweiterte nach Morita et al. [1993] prognostisch am besten korreliert zu sein scheinen, ist der klinische Verlauf dieser Erkrankung im Einzelfall oft unberechenbar [Broich et al. 1997, Miyamoto et al. 2000, Resto et al. 2000, Zumegen et al. 2000]. Das bestätigt sich auch an dem vorliegenden Patientengut. Die bisherigen therapeutischen Konzepte basieren auch bei Aesthesioneuroblastomen auf einem Klassifikationssystem, das nur die morphologischen Parameter der Malignome, d.h. Tumorgröße, Metastasierung und Grading, einbezieht. Die phänotypische Variabilität der Malignome, die sich z.B. im Wachstumsverhalten, der Metastasierung oder dem Auftreten typischer klinischer Symptome manifestiert, ist genetisch bedingt. Aufgabe ist es deswegen, molekulare Marker zu finden, die ein „genetisches Tumorigradung“ ermöglichen, das besser mit der Tumorbilogie korreliert als die morphologischen Parameter und das zur Verbesserung von Therapieprotokollen beiträgt.

Mit der CGH steht seit 1992 eine molekularzytogenetische Methode zur Verfügung, die die umfassende Genomanalyse eines Tumors erlaubt [du Manoir et al. 1993, Kallioniemi et al. 1992]. Basierend auf dem Vergleich von Tumor-DNA und normaler genomischer DNA lässt sich in einem Experiment das genetische bzw. chromosomale Muster des entsprechenden Tumors erfassen. Bisher wurden die meisten CGH-Studien zur Charakterisierung von Bronchialkarzinomen [Levin et al. 1995, Petersen et al. 1997a,

Petersen et al. 1997b, Ried et al. 1994, Schwendel et al. 1997], Mammakarzinomen [Isola et al. 1995, Kallioniemi et al. 1994b], Hirntumoren [Schröck et al. 1994, Weber et al. 1996] und Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches [Bockmühl et al. 1996a/b, 1997, 2000a/b und 2002] durchgeführt. Aufgrund der Rarität des Aesthesioneuroblastoms gibt es weltweit nur 2 Publikationen über molekularzytogenetische Untersuchungen dieses Tumors, wobei Vollrath et al. [1989] über eine tierexperimentelle Studie berichten, in der durch die Applikation von Nitrosaminen bei Ratten provozierte Tumoren der Regio olfactoria untersucht wurden. In der zweiten Arbeit ist lediglich 1 Fall eines Aesthesioneuroblastoms mittels der CGH analysiert worden [Szymas et al. 1997].

Die vorliegende Arbeit ist somit die erste umfassende molekularzytogenetische Studie an der Tumorentität Aesthesioneuroblastom.

Deletionen

In mindestens der Hälfte aller analysierten Proben treten Deletionen im Bereich der chromosomalen Arme 1p, 2q, 3p/q, 4p/q, 5p/q, 6q, 8p/q, 9p, 10p/q, 11p, 12q, 13q, 18q und 21q auf. Dabei zeigen sich häufig DNA-Verluste ganzer Chromosomen: in 16 Fällen des Chromosoms 4, Chromosom 10 in 15 Fällen, 13x Chromosom 3 und 9x Chromosom 5. Zu finden sind auch häufig Deletionen, die sich auf einen gesamten Chromosomarm erstrecken: in 7 Fällen betrifft das 18q, in 5 Fällen 13q und in 4 Fällen 6q. Gipfel der Inzidenzkurve markieren die Regionen 1p21-p31, 3p13-p14, 3p21-p23, 3q13, 4p14-p15, 5p14, 8p21, 8q21, 8q23, 9p21-p23, 11p14, 12q21, 14q21 und 21q21. Besonders deutliche DNA-Verluste sind häufig im Bereich der chromosomalen Regionen 3p12-p13, 3p22, 3p26, 3q13, 3q24-q25, 4p13-p15, 4q sowie der Banden 13q21-q23 nachweisbar.

Obwohl das Neuroblastom und das Aesthesioneuroblastom einen gemeinsamen neurogenen Ursprung haben, scheinen die DNA-Verluste beider Tumorarten nicht ganz gleich zu sein. Beim Neuroblastom sind Deletionen häufig für die Chromosomen 1p, 3, 4, 10, 11q, 14q, 15q und teilweise auch 19 beschrieben [Brinkschmidt et al. 1996]. Die Aesthesioneuroblastome zeigen in unserer Analyse deutlich mehr DNA-Verluste, vor allem die Chromosomen 5p/q, 6q, 8p/q, 9p, 13q, 18q und 21q betreffend. Darüber hinaus finden wir kaum Deletionen der Chromosomen 14q, 15q und 19, sondern eher DNA-Überrepräsentierungen.

Einige Autoren berichten, dass bei Neuroblastomen Allelverluste am häufigsten auf 1p auftreten und ein Zeichen für die äusserst schlechte Prognose dieses Tumors sind [Christiansen & Lampert 1989, Girgert et al. 1996, Schuster & Kreth 1987]. Die 1p-Deletionen finden sich hauptsächlich in den Banden 1p31-pter und werden nur bei den

klinischen Tumorstadien III, IV und IVs beobachtet [Brinkschmidt et al. 1996]. Beim Aesthesioneuroblastom befinden sich die DNA-Verluste auf 1p am häufigsten im Bereich der Banden 1p21-p31. Obwohl diese 1p-Deletionen nicht nur bei ausgedehnten Tumoren nachweisbar sind, ist es besonders bemerkenswert, dass nur die Patienten (N°5, 8, 9, 11, 15 und 16), deren Aesthesioneuroblastome eine 1p-Deletion sowie klinisch das Stadium C oder D und gleichzeitig den histologischen Grad III oder IV aufwiesen, an ihrem Tumorleiden verstorben sind.

Für einzelne der auch beim Aesthesioneuroblastom häufig deletierten chromosomalen Regionen konnten bereits TSG lokalisiert werden, wie z.B. das FHIT-Gen auf 3p14.2 oder p16 auf 9p, PTEN/MMAC1 sowie DMBT1 auf 10q, das Rb-TSG auf 13q und DCC bzw. DPC4 auf 18q. Darüber hinaus konnten einige der Deletionen bei anderen Tumorentitäten mit biologischen Eigenschaften der Tumoren assoziiert werden, wie zum Beispiel 8p- und 18q-Verluste mit einer verkürzten Überlebenszeit [Bockmühl et al. 2000a und 2001, van Dyke et al. 1994] oder 10q-, 11q und 21q-Deletionen mit dem metastatischen Phänotyp [Bockmühl et al. 1997 und 2002, Li et al. 1997, Mollenhauer et al. 1997, Petersen et al. 1998, Steck et al. 1997]. Besonders interessant sind hierbei sicherlich die Deletionen des Chromosoms 10, da vor allem die klinischen Korrelationen mit den Mutationen von PTEN/MMAC1 sowie DMBT1 bei verschiedenen Hirntumoren und auch bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen gefunden wurden [Li et al. 1997, Mollenhauer et al. 1997, Petersen et al. 1998, Steck et al. 1997].

Im Vergleich mit anderen Tumorentitäten lässt sich das genetische Muster der Aesthesioneuroblastome durch bestimmte Alterationen deutlich abgrenzen, so z.B. zu Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches durch die Deletionen von 3q und 5p [Bockmühl et al. 1998 und 2000b]. Histologisch sind die Aesthesioneuroblastome im Grad IV nach Hyams [1983], d.h. die schlecht differenzierten Tumoren, den kleinzelligen Bronchialkarzinomen sehr ähnlich. Deren genetisches Muster gleicht aber eher dem der Plattenepithelkarzinome, vor allem bezüglich der Chromosomen 3q und 5p, während die Deletionen von 10q, 9q und die DNA-Überrepräsentierung von Chromosom 19 auch typisch für die Aesthesioneuroblastome ist [Petersen et al. 1997, Schwendel et al. 1997].

Besonders auffällig sind bei den Aesthesioneuroblastomen die häufigen Verluste ganzer Chromosomen oder Chromosomarme. Hier stellt sich die Frage, ob diese komplexen chromosomalen Veränderungen und damit das Malignom an sich das Resultat von Mutationen sind oder ob sie nicht vielmehr als Ausdruck der Aneuploidie den Ursprung der malignen Transformation bedeuten [Duesberg & Rasnick 2000]?

DNA-Überrepräsentierungen

Bei Aesthesioneuroblastomen zeigen sich die häufigsten DNA-Überrepräsentierungen im Bereich von 1p, 7q, 9q, 11q, 14q, 16p/q, 17p/q, 19p/q, 20p/q und 22p/q. DNA-Zugewinne ganzer Chromosomen finden sich häufig für die Chromosomen 19 (17 Fälle), 22 (12 Fälle) und 17 (11 Fälle). Amplifikationen kompletter Chromosomarme sind häufig für Chromosom 20q (8 Fälle), 1q, 16p und 17q (in jeweils 4 Fällen) zu beobachten. Inzidenzpeaks kennzeichnen die Regionen 7q11.2, 8qter, 9q34, 11q12-13, 16p11, 16pter, 16qter, 17q21, 17q24-25 und 20q12-13.1. Sehr ausgeprägte DNA-Zugewinne, high-copy-Amplifikationen, treten häufig bei 1p33-p36, 17q11-q21, sowie Chromosom 19 und 20 auf.

Beim Neuroblastom lassen sich DNA-Sequenzzugewinne vor allem im Bereich der Chromosomen 2, 7, 12q, 13q, 17q und 18 nachweisen [Brinkschmidt et al. 1996]. Andere Autoren berichten über häufige Amplifikationen auf 2p [Girgert et al. 1996, Shuster & Kreth 1987]. Im Bereich der Region 2p23-p24 ist das N-myc-Gen lokalisiert, und die Amplifikation dieses Onkogens ist bei Neuroblastomen mit einer schlechten Prognose assoziiert. Wir finden bei den Aesthesioneuroblastomen demgegenüber keine charakteristischen DNA-Überrepräsentierungen auf 2p. Demgegenüber zeigen die Aesthesioneuroblastome ausgeprägte DNA-Zugewinne des Chromosoms 17 mit high-copy-Amplifikationen bei 17q11-q21 und 17q24-q25. Bei Neuroblastomen gelten diese Alterationen assoziiert der klinischen Tumorstadien III und IV und der Vorhersage einer schlechten Prognose [Brinkschmidt et al. 1996, Caron 1995].

Im Vergleich wiederum zu den Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches zeigen die Aesthesioneuroblastome häufigere Amplifikationen einzig von 14q, und verglichen mit den kleinzelligen Bronchialkarzinomen zusätzlich auch von 7q11.2, 16q und 17p [Bockmühl et al. 1998 und 2000b, Petersen et al. 1997, Schwendel et al. 1997]. Als charakteristische gemeinsame Alteration kann die DNA-Überrepräsentierung von 11q13 angesehen werden. Sie gilt bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches neben der distalen 3q-Amplifikation als Marker für eine schlechte Prognose [Bockmühl et al. 2000a]. Åkervall et al. [1997] beschreiben darüber hinaus die Korrelation der Amplifikation von Cyclin D1, das auf 11q13 kodiert ist, mit einer kürzeren Überlebenszeit.

Zusammenfassend zeigen die Aesthesioneuroblastome deutlich mehr Deletionen grosser chromosomaler Abschnitte, während die DNA-Überrepräsentierungen lokalisierter sind. Aufgrund der noch geringen Anzahl untersuchter Fälle lässt sich noch keine statistische Aussage über mögliche prognostisch bedeutsame und verwertbare chromosomale

Alterationen machen. Gleiches gilt für den genetischen Vergleich metastasierender mit nicht metastasierenden Aesthesioneuroblastomen. Ein Ansatz ist die 1p-Deletion.

5.3. Klonalitätsbestimmung

Tumoren entwickeln sich klonal aus einer Zelle, deren maligne Transformation über eine Akkumulation mehrerer genetischer Veränderungen erfolgt [Hanahan & Weinberg 2000]. Im Rahmen der weiteren Karzinogenese kann es dann zum Heranreifen einzelner Subklone innerhalb des Tumors kommen. Diese Subklone können die unterschiedlich aggressive biologische Eigenschaften haben und müssen nicht zwangsläufig dem Stammklon entsprechen. Unter diesem Aspekt ist die Frage nach der klonalen Beziehung zwischen dem Primärtumor und seinen Metastasen bzw. die Abgrenzung zu einem syn- oder metachronen zweiten Malignom bei ein und demselben Patienten besonders relevant. Die Unterscheidung zwischen Metastase oder Zweitkarzinom, die bei gleicher Histologie nicht möglich ist, hat klinisch eine grosse Bedeutung für die Festlegung der therapeutischen Strategie.

Um den Klonalitätsnachweis zu führen wurden bisher die Läsionen nur einzelner genetischer Marker, wie beispielsweise eine p53-Mutation, herangezogen [Reichel et al. 1994]. Gegenüber anderen Methoden der Genanalyse bietet jedoch die CGH die Möglichkeit, über ein singuläres Experiment multiple genetische Alterationen des Testgenoms zu überschauen und sie in ihrer Gesamtheit zur Grundlage eines zuverlässigen Vergleiches von korrespondierenden Tumorkörpern machen zu können. Publikationen über sehr ähnliche genetische Muster zwischen Bronchial- bzw. Nierenzellkarzinomen und ihren jeweiligen Metastasen haben eine prinzipielle Eignung der CGH zur Klonalitätsanalyse gezeigt [Gronwald et al. 1997, Schwendel et al. 1997].

Erstmals erfolgt in der vorliegenden Arbeit nicht nur eine Charakterisierung des genetischen Musters von Aesthesioneuroblastomen sondern ebenfalls erstmals auch der genetische Vergleich zwischen primären Tumoren und ihren korrespondierenden syn- oder metachronen Metastasen bzw. ihren Rezidiven. Grundlage dazu sind die CGH-Analysen von 4 primären Aesthesioneuroblastomen und ihren insgesamt 7 korrespondierenden Metastasen und 3 Rezidivtumoren. Bei allen 4 Patienten ist die klonale Übereinstimmung nachweisbar. Der Prozentsatz der identischen chromosomalen Veränderungen liegt bei knapp 55% im Fall der Patienten N°3 und N°7. Die Tumoren der beiden anderen Patienten

zeigen eine genetische Übereinstimmung in 80.6% (N°5) und 95% (N°9). Dieses Ergebnis entspricht Untersuchungen an Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, die durch die Analyse von 38 Primärtumoren und ihren korrespondierenden Lymphknotenmetastasen gezeigt haben, dass die durchschnittliche genetische Kongruenzrate 68% beträgt [Bockmühl et al. 2002]. Durch statistische Auswertungen zeigt dieselbe Arbeitsgruppe auch, dass sich aus dem Pool aller metastatischen Läsionen in 63% der Fälle die Lymphknotenmetastase aufgrund des genetischen Musters korrekt ihrem Primärtumor zugeordnet werden konnte [Bockmühl et al. 2002]. Andererseits gibt es auch Beispiele für ein jeweils eigenständiges genotypisches Aberrationsmuster von Stammneoplasma und Metastase, was durch das während der Kanzerogenese mögliche Heranreifen von Subklonen mit unterschiedlichen genetischen Veränderungen und damit verbunden auch unterschiedlichen spezifischen biologischen Eigenschaften erklärt werden kann [Bockmühl et al. 2002, Kuukasjärvi et al. 1997].

Der Nachweis der Klonalität bei Aesthesioneuroblastomen hat nicht zuletzt z.B. besondere klinische Relevanz für die Abgrenzung dieser Tumorentität gegenüber den neuroendokrinen Tumoren, was histologisch häufig sehr schwierig ist. In Ergänzung der konventionellen histomorphologischen Diagnose könnten solche genetischen Analysen einen wesentlichen Beitrag zur Optimierung des therapeutischen Managements leisten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand in der Überprüfung des chirurgischen Konzeptes bei der Therapie von Aesthesioneuroblastomen und in der erstmaligen molekularzytogenetischen Charakterisierung von Aesthesioneuroblastomen.

Dazu wurden 18 Patienten mit Aesthesioneuroblastomen, die im Zeitraum zwischen 1988 2001 in der HNO-Klinik (17 Patienten) sowie in der Neurochirurgischen Klinik des Klinikums Fulda operiert wurden, untersucht. Von allen Patienten existierten lückenlose Nachbeobachtungsdaten. Von 12 Patienten lag in Paraffin eingebettetes Material vom Primärtumor sowie in 3 Fällen von Rezidiven und in 2 Fällen von mehreren syn- oder metachronen Metastasen vor, das zur molekularzytogenetischen Analyse verwendet wurde. Die daraus resultierenden 22 Aesthesioneuroblastome wurden alle mit Hilfe der Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (CGH) analysiert.

Die Auswertung der vorliegenden Studie erbrachte folgende Resultate:

1. Nach derzeitigem Kenntnisstand besteht die optimale Therapie der Aesthesioneuroblastome in der chirurgischen Resektion des Tumors mit nachfolgender stereotaktischer Bestrahlung.
2. An dem vorliegenden Patientengut sind die Klassifikation nach Kadish [1976] bzw. nach Morita et al. [1993] und das histopathologische Gradingssystem nach Hyams [1983] für die Aesthesioneuroblastome prognostisch relevant.
3. Für die operative Sanierung der Aesthesioneuroblastome und auch anderer Malignome der vorderen Schädelbasis ist das nachfolgende **neue** Fuldaer Konzept empfehlenswert:
 - **Endonasale Resektion**, wenn keine intrakranielle bzw. orbitale Tumordinfiltration vorliegt
 - **Midfacial degloving**, bei weit lateraler Tumorausbreitung
 - **Subfrontaler Zugang**, bei Infiltration des Gehirns
 - **Laterale Rhinotomie nur** bei der Notwendigkeit der simultanen Exenteratio orbitae (bei orbitaler Tumordinfiltration)

4. Aesthesioneuroblastomen sind durch ein typisches genetisches Muster charakterisiert, das Deletionen im Bereich der chromosomalen Arme 1p, 2q, 3p/q, 4p/q, 5p/q, 6q, 8p/q, 9p, 10p/q, 11p, 12q, 13q, 18q und 21q sowie Amplifikationen der Chromosomen 1p, 7q, 9q, 11q, 14q, 16p/q, 17p/q, 19p/q, 20p/q und 22p/q umfasst.
5. Das genetische Muster der Aesthesioneuroblastome unterscheidet sich von dem der Neuroblastome, vor allem durch deutlich mehr DNA-Verluste der Chromosomen 5p/q, 6q, 8p/q, 9p, 13q, 18q und 21q und fehlende Deletionen der Chromosomen 14q, 15q und 19. Das genetische Muster der Aesthesioneuroblastome lässt sich auch von dem anderer Tumorentitäten, so z.B. der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches oder der kleinzelligen Bronchialkarzinome abgrenzen.
6. Die beim Aesthesioneuroblastom häufigen DNA-Verluste im Bereich der chromosomalen Banden 1p21-p31 scheinen mit der Prognose dieser Tumoren assoziiert zu sein. Die Tumoren aller in der vorliegenden Studie am Malignom verstorbenen Patienten zeigten eine Kombination aus 1p21-p31-Deletion, dem Vorliegen des klinischen Stadiums C oder D sowie gleichzeitig einer schlechten Differenzierung (Grad III oder IV).
7. Vermittels der CGH ist es möglich, eine klonale Zuordnung von Metastasen bzw. auch Rezidiven zu ihren primären Aesthesioneuroblastomen vorzunehmen.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit nicht nur neue Ansätze in der chirurgischen Therapie von Aesthesioneuroblastomen sondern auch die erste umfassende molekularzytogenetische Analyse dieser Tumorentität, auf dem Weg, das biologische Verhalten dieser Malignome genauer charakterisieren zu können.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Åkervall JA, Michaelides RJAM, Mineta H, Balm A, Borg A, Dictor MR, Jin Y, Loftus B, Mertens F, Wennerberg JP: Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression, *Cancer* 1997;79:380-389

Baron SH: Brain radiation necrosis following treatment of an esthesioneuroblastoma (olfactory neurozytoma), *Laryngoscope* 1979;89:214-223

Berger L, Luc R, Richard J: L'esthesioneuroepitheliome olfactif, *Bull Assoc Fr etude Cancer* 1924;13:410-421

Berghaus A, Jovanovic S: Technique and indications of extended sublabial rhinotomy ("midfacial degloving"), *Rhinology*. 1991;29:105-110

Biller HF, Lawson W, Lachdev V, Som P: Esthesioneuroblastoma: surgical treatment without radiation, *Laryngoscope* 1990;100:1199-1201

Bilsky MH, Kraus DH, Strong EW, Harrison LB, Gutin PH, Shah JP: Extended anterior craniofacial resection for intracranial extension of malignant tumors, *Am. J. Surg.* 1997;174:565-568

Bissig H, Richter J, Desper R, Meier V, Schraml P, Schaffer AA, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H: Evaluation of the clonal relationship between primary and metastatic renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization, *Am J. Pathol.* 1999;155:267-274

Bockmühl U: Molekularzytogenetische Charakterisierung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, *Laryngol. Rhinol. Otol.* 2000b;79:249-250

Bockmühl U, Ishwad CS, Ferrell RE, Gollin SM: Association of 8p23 deletions with poor survival in head and neck cancer, *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2001;124:451-455

Bockmühl U, Petersen I, Schwendel A, Dietel M: Genetisches Screening von Kopf-Hals-Karzinomen mittels der Komparativen Genomischen Hybridisierung (CGH). *Laryngol. Rhinol. Otol.*, 1996b;75: 408-414

Bockmühl U, Petersen S, Schmidt S, Wolf G, Jahnke V, Dietel M, Petersen I: Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and non metastasizing primary head and neck carcinomas, *Cancer Res.* 1997;57:5213-5216

Bockmühl U, Schlüns K, Küchler I, Petersen S, Petersen I: Genetic imbalances with impact on survival in head and neck cancer patients, *Am J Pathol* 2000a;157:369-375

Bockmühl U, Schlüns K, Schmidt S, Matthias S, Petersen I: Chromosomal alterations during metastasis formation of head and neck squamous cell carcinoma, *Genes Chromosom. Cancer* 2002;33:29-35

Bockmühl U, Schwendel A, Dietel M, Petersen I: Distinct patterns of chromosomal alterations in high and low grade head and neck squamous cell carcinomas, *Cancer Res.* 1996a;56:5325-5329

- Bockmühl U, Wolf G, Schmidt S, Schwendel A, Jahnke V, Dietel M, Petersen I: Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer, *Head Neck* 1998;20:145-151
- Brinkschmidt C, Christiansen H, Terpe HJ, Simon R, Lampert F, Böcker W, Störkel S: Synopse unbalancierter chromosomaler Aberrationen beim Neuroblastom durch komparative genomische Hybridisierung (CGH), *Pathologe* 1996;17:368-373
- Broich G, Pagliari A, Ottaviani F: Esthesioneuroblastoma: a general review of the cases published since the discovery of the tumor in 1924, *Anticancer-Res.* 1997;17(4A):2683-2706
- Cantrell RW, Ghorayet BY, Fitz-Hugh GS: Esthesioneuroblastoma. Diagnosis and treatment, *Ann. Otol.* 1977;86:760-765
- Chapman P, Carter RL, Clifford P: The diagnosis and surgical management of olfactory neuroblastoma: the role of craniofacial resection. *J. Laryngol. Otol.* 1981;95:785-799
- Christiansen H, Lampert F: Tumorcytogenetik und Prognose beim Neuroblastom, *Monatsschr. Kinderheilkd.* 1989;137:666-671
- Caron H: Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastoma, *Med. Pediatr. Oncol.* 1995;24:215-221
- Davis RE, Weissler MC: Esthesioneuroblastoma and neck metastasis, *Head Neck* 1992;14:477-482
- Devoe K, Weidner N: Immunohistochemistry of small round-cell tumors, *Semin. Diagn. Pathol.* 2000;17(3):216-224
- Donald PJ: Frontobasal approach for trauma and tumor. *Minim. Invasive Neurosurg.* 1994;37:37-41
- Doyle PJ, Payton HD: Combined surgical approach to esthesioneuroblastoma, *Trans. Pa. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* 1971;75:526-531
- Draf W, Berghaus A: Tumoren und Pseudotumoren („tumorähnliche Läsionen“) der frontalen Schädelbasis, ausgehend von der Nase, den Nasennebenhöhlen und dem Nasenrachenraum (einschliesslich der operativen Zugänge). *Rhinochirurgisches Referat, Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 1993;1(Suppl):105-18
- Draf W, Samii M: Surgical treatment of malignant tumors of the paranasal sinuses with involvement of the base of the skull, *Strahlenther. Onkol.* 1989;165:474-477
- Draf W, Schauss F: External rhinoplasty: its role in aesthetic and functional surgery of the nose, *Facial Plast. Surg.* 1995;11:228-236
- Dulguerov P, Calcaterra T: Esthesioneuroblastoma: the UCLA experience 1970-1990, *Laryngoscope* 1992;102: 843-849

du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T: Detection of complete and partial chromosome gain and losses by comparative genomic hybridization, *Hum. Genet.* 1993;90:590-610

Duesberg P, Rasnick D: Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own, *Cell Motil. Cytoskelet.* 2000;47:81-107

Eden BV, Debo RF, Larner JM, Kelly MD, Levine PA, Stewart FM, Cantrell RW, Constable WC: Esthesioneuroblastoma: Long-term outcome and patterns of failure – the University of Virginia experience, *Cancer* 1994;73:2556-2562

Elkon D, Hightower SI, Lim ML, Cantrell RW, Constable WC: Esthesioneuroblastoma, *Cancer* 1979;44:1087-1094

Eriksen JG, Bastholt L, Kroghdal AS, Hansen O, Joergensen KE: Esthesioneuroblastoma: what is the optimal treatment? *Acta Oncologica* 2000;39:231-235

Feyerabend T: Die Stellung der Radiotherapie in der Behandlung des Ästhesioneuroblastoms, *HNO* 1990;38:20-23

Girgert R, Treuner J, Schweizer P: Molekularbiologische Merkmale des Neuroblastoms als Grundlage eines Therapiekonzepts, *Langenbecks Arch. Chir. Suppl II (Kongressbericht 1996)* 1996:1053-1055

Gronwald J, Störkel S, Holtgreve-Grez H, Hdaczek P, Brinkschmidt C, Jauch A, Lubinski J, Cremer T: Comparison of DNA gains and losses in primary renal clear cell carcinomas and metastatic sites: Importance of 1q and 3p copy number changes in metastatic events, *Cancer Res.* 1997;57:481-487

Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer, *Cell* 2000;100:57-70

Hirose T, Scheithauer BW, Lopes M.BS, Gerber HA, Altermatt HJ, Harner SG, Vandenberg SR: Olfactory neuroblastoma, an immunohistochemical, ultrastructural, and flow cytometric study, *Cancer* 1995;76(1):4-19

Homize MJ, Elkon D: Olfactory esthesioneuroblastoma – variables predictive of tumor control and recurrence, *Cancer* 1980;46:2509-2513

Hyams VJ: Olfactory neuroblastoma (case 6). In: Batsakis JG, Hyams VJ, Moralea AR. *Special Tumors of the Head and Neck*. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1983:24-29

Irish J, Freeman J, Gullane P, Gentili F, Brown D, Neligan P, O'Sullivan B: Outcome and analysis of the surgical management of esthesioneuroblastoma, *J. Otolaryngol.* 1997;26:1-7

Isola JJ, Kallioniemi OP, Chu LW, Fuqua SAW, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Waldman FM: Genetic aberration detected by Comparative Genomic Hybridization predict outcome in node-negative breast cancer, *Am. J. Pathol.* 1995;147:905-911

Kadish S, Goodman M, Wang CC: Olfactory neuroblastoma: a clinical analysis of 17 cases, *Cancer* 1976;37:1571-1576

Kairemo KJ, Jekunen AP, Kestila MS, Ramsay HA: Imaging of olfactory neuroblastoma – an analysis of 17 cases, *Auris-Nasus-Larynx* 1998;25:173-179

Kallioniemi A., Kallioniemi OP, Piper J, Tanner M, Stokke T, Chen L, Smith HS, Pinkel D, Gray JW, Waldman FM: Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994b;91:2156-2160

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818-821

Kallioniemi A., Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D: Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosom. Cancer* 1994a;10: 231-234

Kempf H-G, Becker G, Weber BP, Ruck P: Diagnostik und Therapie des Olfaktoriusneuroblastoms, *HNO* 1994;42:422-428

Kuukasjärvi T, Karhu R, tanner M, Kähkönen M, Schäffer A, Nupponen N, Pennanen S, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Isola J: Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer, *Cancer res.* 1997;57:1597-1604

Levin NA, Broszka P, Warnock ML, Gray JW, Christman MF: Identification of novel regions of altered DNA copy number in small cell lung tumors, *Genes Chromosom. Cancer* 1995;13:175-185

Levine PA, Debo RF, Meredith SD, Jane JA, Constable WC, Cantrell RW: Craniofacial resection at the University of Virginia (1976-1992): survival analysis. *Head Neck* 1994;16:574-577

Levine PA, Gallagher R, Canntrell RW: Esthesioneuroblastoma: reflections of a 21-years experience, *Laryngoscope* 1999;109:1539-1543

Lewis JS, Hutter R, Tollefsen HR, Foot F: Nasal tumors of olfactory origin, *Arch. Otolaryngol.* 1965;81:169-173

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypania K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R: PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer, *Science* 1997;275:1943-1947

Lund VJ, Milroy C: Olfactory neuroblastoma: clinical and pathological aspects, *Rhinology* 1993;31(1):1-6

Miyamoto RC, Gleich LL, Biddinger W, Gluckman JL: Esthesioneuroblastoma and sinonasal undifferentiated carcinoma: impact of histological grading and clinical staging on survival and prognosis, *Laryngoscope* 2000;110:1262-1265

Moch H, Presti, Jr JC, Sauter G, Buchholz N, Jordan P, Mihatsch MJ, Waldman FM: Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma, *Cancer Res.* 1996;56:27-30

Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wigenbus KK, von Deimling A, Poustka A: DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumors, *Nature Genet.* 1997;17:32-39

Morita A, Ebersold MJ, Oslen KD, Foote R:L, Lewis JE, Quast LM: Esthesioneuroblastoma: Prognosis and Management, *Neurosurgery* 1993;32:706-715

Moure EI: Technique chirurgicale oto-rhino-laryngologique. Premier fascicule, L'oreille et ses annexes, Librairie Octave Dein, Paris, 1922

Obermann HA, Rice DH: Olfactory neuroblastomas: a clinicopathologic study, *Cancer* 1976;38:2494-2502

O'Connor TA, McLean P, Juillard GJF, Parker RG: Olfactory neuroblastoma, *Cancer* 1989;63:2426-2428

Papadaki H, Kounelis S, Kapadia SB, Bakker A, Swalsky PA, Finkelstein SD: Relationship of p53 gene alterations with tumor progression and recurrence in olfactory neuroblastoma, *Am. J. Surg. Pathol.* 1996;20(6):715-721

Parsons JT, Mendenhall WM, Mancuso AA, Cassisi NJ, Million RR: Malignant tumors of the nasal cavity and ethmoid and sphenoid sinuses, *Int.J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1988;14:11-22

Petersen I, Bujard M, Petersen S, Wolf G, Goeze A, Schwendel A, Langreck H, Gellert K, Reichel M, Just K, du Manoir S, Cremer T, Dietel M, Ried T: Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung, *Cancer Res.* 1997a;57:2331-2335

Petersen I, Langreck H, Wolf G, Schwendel A, Psille R, Vogt P, Reichel M, Ried T, Dietel M: Small cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p, *Br. J. Cancer* 1997b :75:79-86

Petersen I, Schwendel A, Bockmühl U, Dietel M: Die Komparative Genomische Hybridisierung: Eine Screeningmethode in der genetischen Tumordiagnostik. *Pathologe*, 1996;17: 333-341

Petersen S, Wolf G, Bockmühl U, Gellert M, Dietel M, Petersen I: Allelic loss on chromosome 10q in human lung cancer: association with tumor progression and metastatic phenotype, *Br. J. Cancer* 1998;77:270-276

Ranjan D, Hennessy RG: Esthesioneuroblastoma: cerebral and spinal metastases without direct cranial invasion, *J. Neurooncol.* 1986;4:71-74.

Raveh J, Laedrach K, Speiser M, Chen J, Vuillemin T, Seiler R, Ebeling U, Leibinger K: The subcranial approach for fronto-orbital and anteroposterior skull-base tumors. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1993;119:385-93.

Reichel MB, Ohgaki H, Petersen I, Kleihues P: p53 mutations in primary human lung tumors and their metastases, *Mol. Carcinog.* 1993:139-143

Resto VA, Eisele DW, Forastiere A, Zahurak M, Lee D-L, Westra WH: Esthesioneuroblastoma: the Johns Hopkins experience, *Head Neck* 2000;22:550-558

Ried T, Petersen I, Holtgreve-Grez H, Speicher MR, Schröck E, du Manoir S, Cremer T: Mapping of multiple DNA gains and losses in primary small cell lung carcinomas by comparative genomic hybridization, *Cancer Res.* 1994;54:1801-1806

Roth K, Wolf G, Dietel M, Petersen I: Image analysis for Comparative genomic Hybridization based on a karyotyping program for Windows. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 1997;19:461-474

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molekular Cloning: A Laboratory Manual.* 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989

Samii M, Draf W: *Surgery of the Skull Base.* Heidelberg, Berlin, New York: Springer, 1989

Schmidt JL, Zarbo RJ, Clark JL: Olfactory neuroblastoma: Clinico-pathologic and immunohistochemical characterization of four representative cases, *Laryngoscope* 1990;100:1052-1058

Schröck E, Thiel G, Lozanova T, du Manoir S, Meffert M-C, Jauch A, Speicher MR, Nürnberg P, Vogel S, Jänisch W, Donis-Keller H, Ried T, Witkowski R, Cremer T: Comparative genomic hybridization of human malignant gliomas reveals multiple amplification sites and nonrandom chromosomal gains and losses, *Am. J. Pathol.* 1994;144:1203-1218

Schuster V, Kreth HW: Molekularbiologische Aspekte des Neuroblastoms, *Monatsschr. Kinderheilkd.* 1987;135:672-676

Schwendel A, Langreck H, Reichel M, Schröck E, Ried T, Dietel M, Petersen I: Primary small cell lung carcinomas and their metastases are characterized by a recurrent pattern of genetic alterations, *Int. J. Cancer* 1997;74:86-93

Simon JH, Zhen WN, McCulloch TM, Hoffman HT, Paulino AC, Mayr NA, Buatti JM: Esthesioneuroblastoma: the University of Iowa experience 1978-1998, *Laryngoscope* 2001;111:488-493

Smith RR, Klopp CT, Williams JM: Surgical treatment of cancer of the frontal sinus and adjacent areas, *Cancer* 1954;7:991-994

Spaulding CA, Kranyak MS, Constable WC, Stewart FM: Esthesioneuroblastoma: a comparison of two treatment eras, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1988;15:581-590

Speicher MR, du Manoir S, Schröck E, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Lengauer C, Cremer T, Ried T: Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification, *Hum. Mol. Genet.* 1993;2:1907-1914

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WKA, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DHF, Tavtigian SV: Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers, *Nature Genet.* 1997;15:356-362

Szymas J, Wolf G, Kowalczyk D, Nowak S, Petersen I: Olfactory neuroblastoma: Detection of genomic imbalances by comparative genomic hybridization, *Acta Neurochir. (Wien)* 1997;139:839-844

van Dyke D, Worsham MJ, Benninger MS, Krause CJ, Baker SR, Wolf GT, Drumheller T, Tilley BC, Carey TE: Recurrent cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinomas of the head and neck region, *Genes Chromosom. Cancer* 1994;9:192-206

Verma RS, Babu A: *Human Chromosomes: Principles and Techniques.* 2. Auflage, McGraw-Hill, New York, 1994

Vollrath M: Chemically induced esthesioneuroepithelioma: a cytogenetic, cell culture and biochemical investigation with implications for tumor histogenesis, *Arch. Otorhinolaryngol.* 1989;246:71-78

Walch C, Stammberger H, Unger F, Angerhuber W: Ein neues Therapiekonzept bei Ästhesioneuroblastom, *Laryngol. Rhinol. Otol.* 2000;79:743-748

Weber R, Keerl R, Draf W, Schick B, Mosler P, Saha A: Management of dural lesions occurring during endonasal sinus surgery. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1996;122:732-736.

Weber R, Sabel M, Reifenberger J, Sommer C, Oberstraß J, Reifenberger G, Kiessling M, Cremer T: Characterization of genomic alterations associated with glioma progression by comparative genomic hybridization, *Oncogene* 1996;12:983-994

Wick MR, Stanley SJ: Immunohistochemical diagnosis of sinonasal melanoma, carcinoma, and neuroblastoma with monoclonal antibodies HMB-45 and anti-synaptophysin, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1988;112:616-620

Wright K, Manos MM: *PCR Protocols: A guide to methods and amplications.* Academic Press Inc., 1990:153-158

Zappia JJ, Carroll WR, Wolf GT, Thornton AT, Ho L, Krause CJ: Olfactory neuroblastoma: the results of modern treatment approaches at the University of Michigan, *Head Neck* 1993;15:190-196

Zumegen C, Michel O: Problematik der Klassifikation und Prognose des Aesthsioneuroblastoms anhand von sieben therapierten Fällen, *Laryngol. Rhinol. Otol.* 2000;79:736-742

8. ANHANG

Klassifikationen der Aesthesioneuroblastome

1. nach **Kadish et al.** (1976)

- A Der Tumorbefall ist begrenzt auf die Nasenhaupthöhle
- B Tumoreinbruch in die Nasennebenhöhlen
- C Überschreitung von Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen

2. nach **Morita et al.** (1993)

- A Der Tumorbefall ist begrenzt auf die Nasenhaupthöhle
- B Tumoreinbruch in die Nasennebenhöhlen
- C Überschreitung von Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen
- D Entwicklung von Metastasen

3. nach **Biller et al.** (1990)

- T1 Befall von Nasenhaupt- und Nebenhöhlen mit Ausnahme der Keilbeinhöhle
- T2 Tumoreinbruch in den Hirnschädel, die Orbita oder die Keilbeinhöhle
- T3 Infiltration des Hirngewebes
- T4 Inoperable Tumorausdehnung
- N Lymphknotenbefall
- M Fernmetastasen

4. nach **Dulguerov et al.** (1992)

- T1 Befall von Nasenhaupt- und Nebenhöhlen mit Ausnahme der Keilbeinhöhle
 - T2 T1 mit Befall der Keilbeinhöhle
 - T3 Tumoreinbruch in die Orbita und die Schädelbasis
 - T4 Infiltration des Hirngewebes
-

Abkürzungsverzeichnis

CCD	-	charge-coupled device
DAPI	-	4,6-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DCC	-	deleted in colorectal cancer
DMBT1	-	deleted in malignant brain tumors 1
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
FISH	-	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	-	Fluorescein-Avidin
FHIT	-	fragile histidine triad
MMAC1	-	mutated in multiple advanced cancers 1
PBS	-	phosphate buffered saline
PTEN	-	protein tyrosine phosphatase domain
p16	-	multiple tumor suppressor 1
Rb	-	Retinoblastom-Tumorsuppressorgen
SDS	-	sodium dodecylsulphate
SSC	-	sodium chloride/sodium citrate buffer
TRITC	-	Anti-Digoxigenin-Rhodamin
TSG	-	Tumorsuppressorgen

LEBENS LAUF

Vorname: Xuejun
Familienname: You
Geschlecht: männlich
Geburtstag: 14.04.1965
Geburtsort: Hubei, V. R. China
Staatsangehörigkeit: chinesisch
Familienstand: verheiratet
Adresse: HNO – Universitätsklinik
 Tongji Medizinische Fakultät
 Huazhong Universität für Wissenschaft und Technologie
 Jie Fang Da Dao 1095
 430030 Wuhan
 V.R. China

Schulbildung: 09.1972-07.1977 Grundschule
 09.1977-07.1983 Mittelschule mit Abitur
 09.1983-06.1989 Medizinstudium mit Examen an der Tongji
 Medizinischen Universität, einschliesslich
 eines einjährigen Deutschstudiums sowie
 einjährigen Praktikums
 09.1992-06.1995 Akademische Magister-Arbeit mit Zeugnis

Berufliche Tätigkeit: 07.1989–08.1992 Assistenzarzt
 07.1995–06.1997 Assistenzarzt
 07.1997–10.2001 Oberarzt an der Universitäts-HNO-Klinik der
 Tongji Universität (V.R. China)
 11.2001-10.2002 Stipendium des chinesischen
 Bildungsministeriums für Gastarztstelle an
 der HNO-Klinik des Klinikums Fulda
 (Direktor: Prof. Dr. med. W. Draf)

X. J. You

Fulda , den 28. 06. 2002

PUBLIKATIONSLISTE

(Artikel in Chinesisch, englische Zusammenfassung)

1. Xuejun You, Shenwei Tan: Der diagnostische Wert der Messung der Aktivität der β - Glucuronidase im Secretum des oberen Aerodigestivtraktes und Serum bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich. Chin J Otorhinolaryngol, 1996, 31(3) : 181-184
2. Xuejun You, Lianhua Chai, Shenwei Tan: Der diagnostische Wert der Messung der Aktivität der α - L - Fucosidase im Secretum des oberen Aerodigestivtraktes bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich. Acta Univ Med Tongji , 1999, 28(1) : 49-51
3. Xuejun You, Qixue Gao, Hongyan Huang, Yanling Tao, Yonghua Cui: Die Mikrowellendiathermie der Choanalatresie wegen Radiotherapie unter dem nasalen Endoskop. J Clin Otorhinolaryngol(China), 1999, 13(2) : 56-57
4. Xuejun You, Qixue Gao, Yonghua Cui: Die Korrektur der oberen und /oder hinteren Septumdeviationen unter dem nasalen Endoskop. J Clin Otorhinolaryngol(China), 1999, 3(9) : 392-393
5. Xuejun You, Qixue Gao, Yonghua Cui, Zheng Liu: Die Anwendung der Mikrowellen in der Chirurgie vom Sinus maxillaris unter dem nasalen Endoskop. Acta Univ Med Tongji , 2001, 30(1): 59-60
6. Xuejun You, Zheng Liu, Qixue Gao, Yonghua Cui: Die Mikrowellentherapie der gutartigen Tumoren von dem Zungengrund und der Epiglottis. J Huazhong Univ Sci Tech (Health Sci), 2002, 31(1) : 94-95

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt,

dass gegen mich keine staatsanwaltlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,

dass von mir weder früher noch gleichzeitig ein Promotionsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,

dass die vorliegende Promotionsschrift von mir selbst ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst und die beschriebenen Ergebnisse von mir selbst gewonnenen wurden,

dass die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften sowie die Literatur vollständig angegeben sind,

daß mir die geltende Promotionsordnung bekannt ist.

X. J. You

Fulda , den 28. 06. 2002

DANKSAGUNG

Für die Überlassung des Themas sowie für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen und klinischen Arbeit möchte ich meiner verehrten Betreuerin Frau Priv.-Doz. Dr. med. U. Bockmühl und sehr geehrtem Herrn Prof. Dr. med. W. Draf, dem Direktor der HNO-Klinik des Klinikums Fulda, von ganzem Herzen danken. Ihre gewissenhaften Arbeitsstile bei der Erforschung, ihre sorgfältigen, freundschaftlichen Art und Weisen des Verhaltens bei der klinischen Tätigkeit werden endlos positive Einflüsse auf mich für meine zukünftige Arbeit erzeugen.

Mein Dank gilt weiter Herrn Prof. Dr. med. I. Petersen für die Betreuung der molekularzytogenetischen Arbeiten in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie der Charité.

Für die Hilfe bei der Laborarbeit danke ich Frau M. Pacyna–Gengelbach und Frau N. Deutschmann auf das herzlichste.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. H. Arps, dem Direktor des Institutes für Pathologie des Klinikums Fulda, für die freundliche Überlassung der pathologischen Klassifikation und Bilder.

Allen verehrten deutschen Kolleginnen und Kollegen der HNO–Klinik des Klinikums Fulda möchte ich hier herzlich danken, eben mit ihrer freundlichen und gütigen Hilfe habe ich meinen ganzen Fortbildungsaufenthalt mit schöner Erinnerung in Fulda wie zu Hause sehr fröhlich erlebt.

Und nicht zuletzt bin ich meiner Ehefrau Xin Fang und meiner Tochter Fang You ausserordentlich dankbar, nur unter ihrer Ermunterung und Unterstützung aus China habe ich diese Dissertationsschrift in Fulda schaffen können.